

ANNALES

DE

L'INSTITUT PASTEUR

PRÉPARATION D'ANTITOXINE ANTITÉTANIQUE PAR IMMUNISATION DES CHEVAUX AVEC DES ANATOXINES TÉTANIQUES DE HAUTE PURETÉ

par M. RAYNAUD, A. TURPIN, E. H. RELYVELD, R. CORVAZIER
et O. GIRARD (*).

(Institut Pasteur, Annexe de Garches)

Les anatoxines brutes diphtérique ou tétanique contiennent, en dehors de la toxine proprement dite, un grand nombre d'antigènes [1] que nous proposons d'appeler antigènes accessoires [2].

Les sérums des animaux immunisés avec ces anatoxines brutes sont donc des sérums « complexes » qui contiennent, à côté de l'antitoxine proprement dite, de nombreux anticorps accessoires dont la présence peut amener des interférences dans l'étude quantitative de la réaction toxine-antitoxine.

Nous avons montré [3, 4] que l'emploi d'anatoxines diphtériques purifiées permettait d'obtenir des sérums ne contenant comme anticorps antidiphtériques que l'antitoxine proprement dite. Ces « sérums à une zone » facilitent ensuite l'identification de la toxine dans les réactions de précipitation spécifique en gel ou dans l'immunoélectrophorèse [5].

Par ailleurs, on sait depuis longtemps [6 à 21] que l'hyperimmunisation de chevaux possédant une immunité de base avant le

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 5 février 1959.

début de l'hyperimmunisation donne de meilleurs résultats que l'hyperimmunisation de chevaux neufs. Nous avons vérifié que

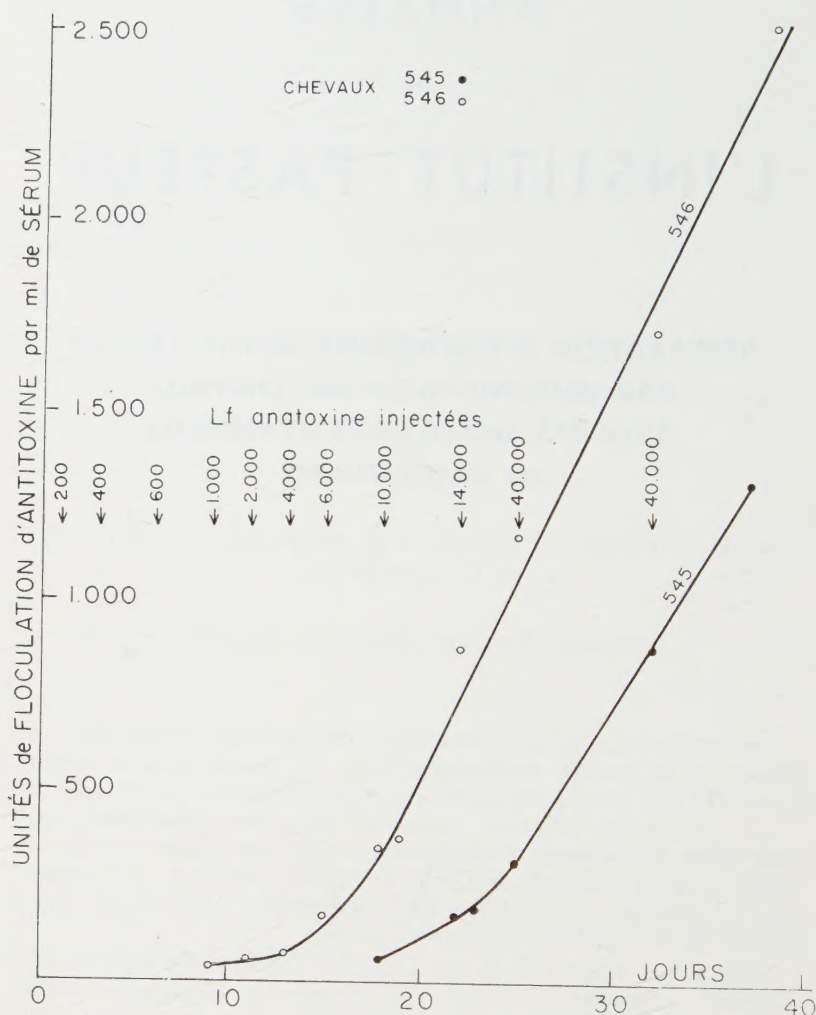


Fig. 1. — Evolution des anticorps flocculants chez les chevaux 545 et 546 antérieurement vaccinés. Anatoxine adsorbée sur phosphate de calcium. Pureté: 2 400 Lf/mg N. Début d'immunisation: 15 avril 1957.

les différences entre ces deux types d'animaux sont encore plus marquées lorsqu'on emploie pour l'immunisation des anatoxines diphtériques de haute pureté [3, 4]. L'hyperimmunisation de

chevaux à Schick-positif nous a donné en effet des sérums de haut titre flocculant, de faible pouvoir neutralisant et de faible avidité [4].

Nous avons donc été amenés à effectuer des expériences parallèles en ce qui concerne l'hyperimmunisation antitétanique. Nous

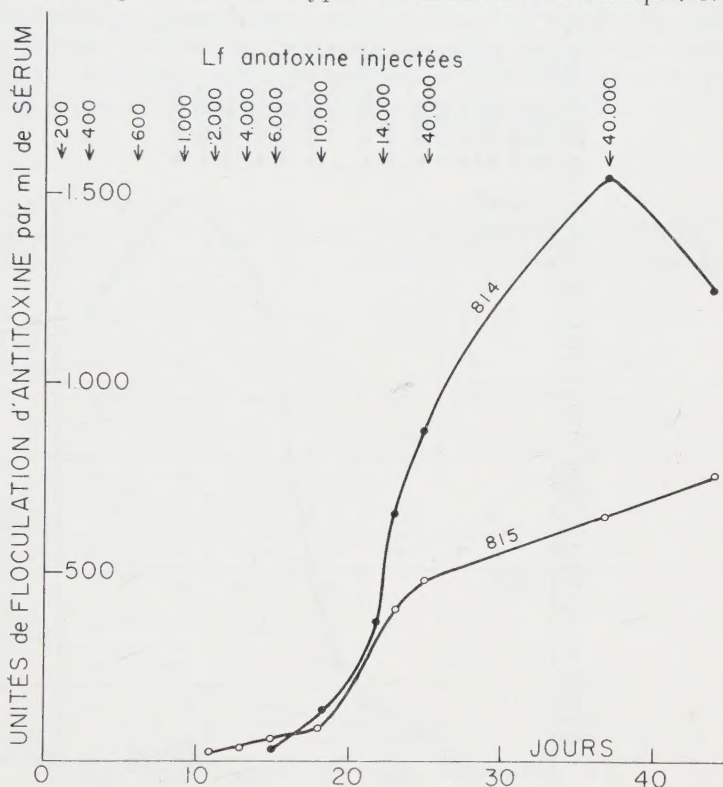


FIG. 2. — Evolution des anticorps flocculants chez les chevaux 814 et 815, non vaccinés antérieurement. Anatoxine adsorbée sur phosphate de calcium. Pureté : 2 400 Lf/mg N. Début d'immunisation : 15 avril 1957.

avons immunisé avec des anatoxines tétaniques purifiées et adsorbées (1) deux groupes de chevaux.

Groupe I : chevaux vaccinés antérieurement contre le tétanos [animaux avec immunité de base ancienne] (fig. 1).

Groupe II : chevaux neufs non vaccinés (fig. 2).

(1) Sauf pour un animal [mulet 458] (fig. 3), où l'anatoxine était adsorbée sur du phosphate d'alumine préparée selon Ramshort [22] ; les anatoxines étaient adsorbées sur phosphate de calcium préparé suivant des modalités décrites antérieurement [23].

Ces chevaux non vaccinés sont dépourvus d'immunité de base. Il n'existe pas d'immunité naturelle antitétanique chez le cheval [14, 24], alors que de nombreux chevaux peuvent présenter une immunité naturelle antidiphthérique [6 à 21].

Les anatoxines tétaniques utilisées ont été obtenues en détoxi-

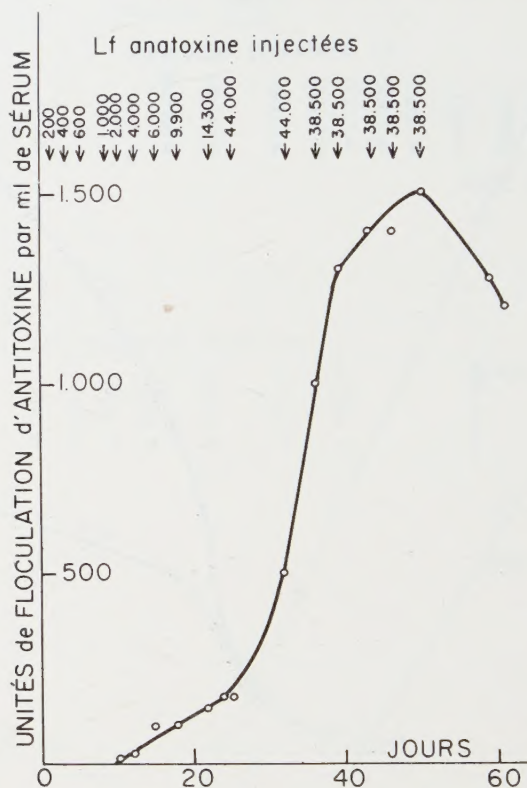


FIG. 3. — Evolution des anticorps floculants chez le mulet n° 458, antérieurement vacciné. Anatoxine tétanique purifiée (3 500-4 400 Lf/mg N.) adsorbée sur phosphate d'alumine. Les doses injectées sont indiquées sur la figure et exprimées en unités de floculation d'anatoxine. Début d'immunisation : 3 octobre 1955.

fiant par le formol certaines des préparations isolées lors de la purification de la toxine tétanique. La toxine brute de départ est préparée par extraction par les solutions hypertoniques de corps microbiens tétaniques lavés [25, 26]. Le principe de la méthode de purification a déjà été décrit brièvement [27] et fera l'objet d'une publication plus détaillée [28].

Les anatoxines utilisées titraient entre 2 150 et 2 450 Lf par

mg N. Analysées par précipitation spécifique en gel, selon la technique Oakley-Fulthorpe [29], elles présentaient un constituant prédominant, la toxine, et deux autres antigènes accessoires.

Le pouvoir immunogène de ces deux antigènes accessoires administrés en même temps que la toxine s'est révélé très faible. Les sérums obtenus ne présentent en effet pendant une longue période qu'un seul anticorps précipitant décelable. Ce n'est qu'à la fin d'une très longue période d'hyperimmunisation que l'on

TABLEAU I.

SÉRUM	JOUR ⁽¹⁾	Lf ⁽²⁾	Kf ⁽³⁾	L+/Lf	Nombre de Zones ⁽⁴⁾	Lf/mgN ⁽⁵⁾	Immunoélectrophorèse ⁽⁶⁾		
							Y	β ₂	α
458 VACCINÉ	15	100	80m	—	—	—	+	+	
	24*	275	75m	0,70	1(+1)	22,4	++	+++	
	32	500	13m	2,70	—	40	+	+++	+
	58*	1.270	15m	1,20	1(+1)	76,2	0	++++	traces
	61*	1.200	15m	1,40	1(+3)	98	0	++++	traces
545 VACCINÉ	18	55	27m	1,64	1	—	traces	+	0
	23*	184	35m	2,50	1(+2)	15,8	0	+++	0
	37*	1.310	27m	1,07	1(+1)	101	0	+++	0
546 VACCINÉ	9	43	65m	1,30	1	—	±	+	0
	19*	372	10m	1,80	1(+1)	34,1	±	+++	0
	37*	2.625	3m	1,30	1	205	±	+++	0
814 NON VACCINÉ	15	35	40m	0,86	1(+1)	—	+	+	0
	23*	656	23m	0,91	1(+1)	61	±	++++	0
	44*	1.250	10m	1,40	1(+1)	104	0	++++	0
815 NON VACCINÉ	18	90	20m		1	—	+	+	0
	23*	400	60m	0,02	1	30	++	++	0
	44*	660	20m	0,19	1	54	++	++	

TABLEAU I. — (1) Nombre de jours après le début de l'hyperimmunisation. (2) Titre *in vitro* exprimé en unités de floculation (anticorps) par millilitre. (3) Kf: Temps de floculation exprimé en minutes. Technique Ramon. Toxine brute standard du laboratoire. Concentration en toxine: 50 Lf/ml (1 ml). Température, 45°. (4) Nombre des anticorps, déterminé par précipitation spécifique en gel, contre une toxine tétanique brute complexe. (5) Unités de floculation anticorps par milligramme d'N total du sérum. (6) Localisation de l'antitoxine, dans la fraction correspondante des globulines. L'identification de l'antitoxine est assurée par emploi d'une toxine pure comme agent de détection. * A la date correspondante, on a effectué une grande saignée de 6 l pour obtenir de grandes quantités de sérum destinées à l'étude de la réaction de précipitation quantitative.

voit apparaître, et chez certains chevaux seulement, des anticorps contre ces antigènes accessoires (tableau I).

La purification a donc éliminé les antigènes accessoires pourvus d'un fort pouvoir immunogène, antigènes qui sont certainement présents dans les anatoxines brutes ordinaires. Les sérums préparés avec ces anatoxines brutes donnent en effet de très nombreux anticorps accessoires (pl. I), qui pour la plupart résistent, comme l'antitoxine, à la digestion pepsique ménagée (pl. II). On peut identifier facilement dans ces sérums complexes l'antitoxine par emploi de la toxine tétanique pure à 1 zone (toxine à 3 800 Lf/mg N).

Nous avons détecté le nombre des anticorps (antitoxine et anticorps accessoires) au cours de l'hyperimmunisation en effectuant des saignées d'essai assez rapprochées.

Pour un nombre plus restreint de saignées, nous avons déterminé la nature électrophorétique de l'antitoxine par la méthode immunoélectrophorétique de Grabar-Williams [30] avec détection par la toxine tétanique pure. L'antitoxine est d'abord localisée dans les gamma- et les bêta-2-globulines, puis uniquement dans les bêta-2-globulines. Nous avons, dans certains cas et pour une période transitoire, trouvé l'antitoxine associée à une globuline de mobilité voisine de celle des alpha-globulines (pl. III et tableau I). L'activité neutralisante a été déterminée sur cobaye au niveau L+/10 [31]. Elle est exprimée en unités internationales.

Le pouvoir floculant a été mesuré par la technique de Ramon [32] avec une toxine intermédiaire, standardisée vis-à-vis de l'étalon international de floculation.

La toxine étalon intermédiaire était soit une toxine brute, soit la toxine purifiée « à 1 zone ». Nous n'avons pas trouvé, en général, de différence dans les titres floculants déterminés avec ces deux types de toxine ; les sérums obtenus par immunisation avec les anatoxines purifiées ne présentent, en effet, qu'une seule zone, un seul anticorps précipitant antitétanique. Les titres floculants comparés à ceux de l'étalon international par le relais de la toxine sont donc connus sans ambiguïté. Nous verrons plus loin l'importance de cette observation.

RÉSULTATS ET DISCUSSION.

Les chevaux vaccinés antérieurement (avec immunité de base) ont donné des sérums de rapport L+/Lf élevé, en général supérieur à 1. Ce rapport a présenté une valeur voisine de 2 ou 3 vers le milieu de l'hyperimmunisation, puis est revenu à une valeur voisine de 1 (tableau I).

On vérifie donc l'observation de Ramon [33], à savoir : qu'en

fin d'hyperimmunisation, les chevaux antérieurement vaccinés peuvent donner des sérums pour lesquels il y a une bonne concordance entre les titres *in vivo* et *in vitro* (2).

Les valeurs élevées du rapport $L+/Lf$, trouvées dans la phase intermédiaire, posent des problèmes plus délicats. L'interprétation de ces discordances a pu être établie par l'étude des courbes de précipitation quantitative, qui fera l'objet d'une autre communication [34].

Pour les deux chevaux non vaccinés antérieurement sans immunité de base, l'un (n° 814) a présenté une évolution relativement simple. Le rapport $L+/Lf$ a augmenté légèrement sans présenter de grandes variations comme dans les cas précédents. L'antitoxine est restée peu de temps localisée dans les gamma-globulines et a été très vite de façon quasi exclusive dans les bêta-2-globulines. Les pouvoirs floculant et neutralisant ont évolué de façon sensiblement parallèle.

Le deuxième cheval non vacciné (n° 815) a présenté une évolution toute différente, qui rappelle celle des chevaux à Schick-positif immunisés avec la toxine diphtérique pure. Le titre floculant a augmenté progressivement et régulièrement, le pouvoir neutralisant est resté faible.

Si l'on ne mesure que le pouvoir neutralisant, on est amené à considérer que les chevaux qui répondent comme le n° 815 sont simplement de mauvais producteurs d'antitoxine antitétanique. Notre observation se raccorde ainsi sous cet aspect à celles de nombreux auteurs antérieurs [13, 14, 15, 16, 17, 18, 21]. Mais l'étude du pouvoir floculant avec la toxine pure, confirmée par l'examen des diverses saignées par la précipitation spécifique en gel, montre que malgré ce faible taux neutralisant, le cheval 815 a répondu par la formation d'un taux relativement élevé d'anticorps floculants antitétaniques. Les chevaux non vaccinés répondent souvent à l'hyperimmunisation antitétanique comme le cheval n° 815, donnant des sérums qui pendant une assez longue période présentent les caractères particuliers des sérums non avides [35, 36].

Chez le mouton non vacciné, Ramon et Richou [37] ont aussi obtenu des sérums antitétaniques non avides (3).

Les sérums de ce type ont en général un rapport $L+/Lf$ assez faible et la détermination de leur titre neutralisant est difficile

(2) En règle générale cependant, les sérums de chevaux vaccinés et hyperimmunisés avec une anatoxine brute ont un rapport $L+/Lf$ compris entre 2 et 3.

(3) Il faut cependant noter que les ruminants présentent souvent une immunité naturelle antitétanique qu'il convient de rechercher avant de commencer l'hyperimmunisation.

et assez aléatoire, car dans les conditions standardisées prévues pour cette mesure, les résultats dépendent beaucoup de la concentration absolue en antitoxine (niveau de titrage).

La faible avidité de ces sérums n'est pas liée à la nature électrophorétique particulière de l'antitoxine.

Cinader [38], Cinader et Weitz [39, 40] ont étudié les variations d'avidité de sérums antitétaniques obtenus chez les chevaux antérieurement vaccinés et ont conclu de leur étude que les gamma-antitoxines étaient chez ces animaux plus avides que les bêta-2-antitoxines.

Kekwick [41], Kekwick et Record [42] avaient soutenu une opinion analogue pour les sérums antidiptériques.

La faible avidité des sérums de titre flocculant élevé et de pouvoir neutralisant faible, type 815, semble relever de causes plus complexes, que l'étude des courbes de précipitation quantitative permet de mettre en évidence et qui feront l'objet d'une publication ultérieure [34].

RÉSUMÉ.

Divers chevaux ont été hyperimmunisés avec une anatoxine tétanique purifiée. Certains de ces chevaux présentaient avant l'hyperimmunisation une immunité de base acquise (vaccination antérieure ancienne), les autres en étaient dépourvus (chevaux antérieurement non vaccinés).

Chez le cheval antérieurement vacciné, on observe toujours un stade vers le milieu de l'immunisation où le rapport $L+/Lf$ présente une valeur élevée (2 à 3). Le rapport $L+/Lf$ baisse ensuite vers la fin.

Chez les chevaux non antérieurement vaccinés, le rapport $L+/Lf$ présente des valeurs plus faibles très inférieures à 1, ou voisines de 1.

L'antitoxine antitétanique peut être associée aux gamma- ou aux bêta-2-globulines du sérum de cheval.

Les gamma-antitoxines n'ont pas dans tous les cas un rapport $L+/Lf$ élevé.

LÉGENDE DE LA PLANCHE I

PRÉCIPITATION SPÉCIFIQUE EN GEL.

Couche inférieure : Sérum antitétanique complexe AT. Préparation commerciale obtenue par le mélange de divers sérums *non digérés*. Concentration finale après solidification par la gélose : 250 Lf/ml. *Couche moyenne* : Gélose. *Couche supérieure* : Toxine tétanique (non gélifiée) brute (M) ou purifiée (T). Concentrations décroissantes de gauche à droite : 1 000, 500, 250, 100, 50 Lf/ml.

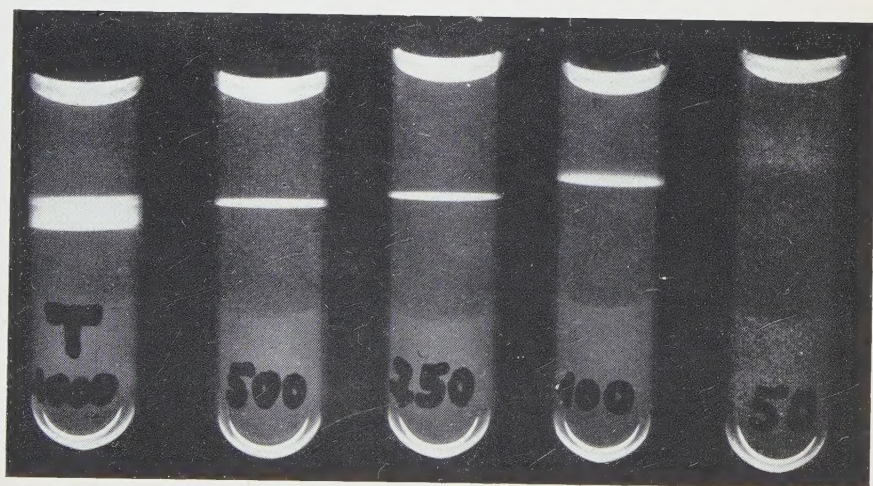
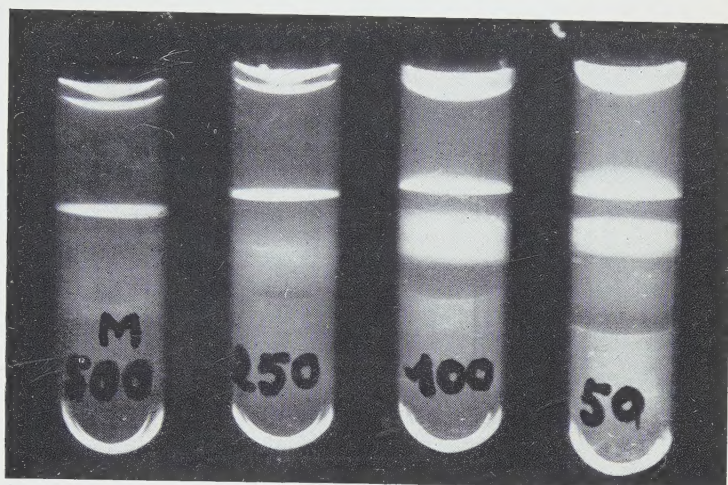


PLANCHE I.

LÉGENDE DE LA PLANCHE II

PRÉCIPITATION SPÉCIFIQUE EN GEL.

Couche inférieure : Sérum antitétanique complexe (n° 1429) : préparation commerciale obtenue par digestion pepsique d'un mélange de divers sérums. Concentration finale après solidification par la gélose : 250 Lt/ml. *Couche moyenne* : Gélose. *Couche supérieure* : Toxine tétanique (non gélifiée) brute (M) ou purifiée (T). Concentrations décroissantes de gauche à droite : 1 000, 500, 250, 100, 50 Lt/ml.

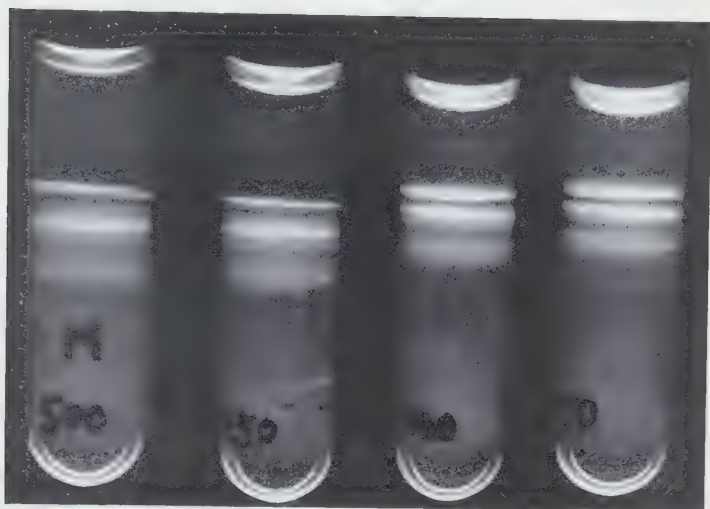


PLANCHE II.

LÉGENDE DE LA PLANCHE III

A. — *Première ligne* : Sérum 458. Saignée du 26 octobre 1955 (24^e jour), dilué au 1/2 (137 Lf/ml). Détection par toxine pure. Rigole supérieure : 100 Lf/ml. Rigole inférieure : 50 Lf/ml. *Deuxième ligne* : Sérum 458. Saignée du 26 octobre 1955 (24^e jour), dilué à 1/2,75 (100 Lf/ml). Détection par toxine pure. Rigole supérieure : 200 Lf/ml. Rigole inférieure : 100 Lf/ml. *Troisième ligne* : Sérum 458. Saignée du 3 novembre 1955 (32^e jour), dilution au 1/4 (125 Lf/ml). Détection toxine pure. Rigole supérieure : 200 Lf/ml. Rigole inférieure : 100 Lf/ml. Noter la présence d'un constituant antitétanique, ayant une mobilité voisine de celle des α -globulines. *Quatrième ligne* : Sérum 458. Saignée du 29 novembre 1955 (58^e jour), dilution au 1/12,7 (100 Lf/ml). Détection par la toxine pure. Rigole supérieure : 50 Lf/ml. Rigole inférieure : 100 Lf/ml.

B. — *Première ligne* : Sérum 545. Saignée du 7 mai 1957 (23^e jour), dilution au 1/2 (92 Lf/ml). Détection toxine pure. Rigole supérieure : 25 Lf/ml. Rigole inférieure : 50 Lf/ml. *Deuxième ligne* : Sérum 545. Saignée du 21 mai 1957 (37^e jour), dilution au 1/13 (environ 100 Lf/ml). Détection toxine pure. Rigole supérieure : 50 Lf/ml. Rigole inférieure : 100 Lf/ml.

C. — *Première ligne* : Sérum 546. Saignée du 3 mai 1957 (19^e jour), dilution au 1/3,7 (100 Lf/ml). Détection toxine pure. Rigole supérieure : 100 Lf/ml. Rigole inférieure : 50 Lf/ml. *Deuxième ligne* : Sérum 546. Saignée du 21 mai 1957 (37^e jour), dilution au 1/26 (environ 100 Lf/ml). Détection toxine pure. Rigole supérieure : 50 Lf/ml. Rigole inférieure : 100 Lf/ml.

D. — *Première ligne* : Sérum 814. Saignée du 2 mai 1957 (18^e jour), dilution au 1/2 (65 Lf/ml). Rigole supérieure toxine brute : 50 Lf/ml. Rigole inférieure toxine pure : 50 Lf/ml. *Deuxième ligne* : Sérum 814. Saignée du 7 mai 1957 (23^e jour), dilution au 1/6,5 (100 Lf/ml). Détection toxine pure. Rigole supérieure : 50 Lf/ml. Rigole inférieure : 100 Lf/ml. *Troisième ligne* : Sérum 814. Saignée du 28 mai 1957 (44^e jour), dilution au 1/12,5 (100 Lf/ml). Détection toxine pure. Rigole supérieure : 50 Lf/ml. Rigole inférieure : 100 Lf/ml.

E. — *Première ligne* : Sérum 815. Saignée du 2 mai 1957 (18^e jour), dilution au 1/2 (45 Lf/ml). Détection toxine pure. Rigole supérieure 100 Lf/ml. Rigole inférieure : 50 Lf/ml. *Deuxième ligne* : Sérum 815. Saignée du 7 mai 1957 (23^e jour), dilution au 1/2 (200 Lf/ml). Détection toxine pure. Rigole supérieure : 100 Lf/ml. Rigole inférieure : 50 Lf/ml. *Troisième ligne* : Sérum 815. Saignée du 28 mai 1957 (44^e jour), dilution au 1/2 (330 Lf/ml). Détection toxine pure. Rigole supérieure : 50 Lf/ml. Rigole inférieure : 25 Lf/ml.

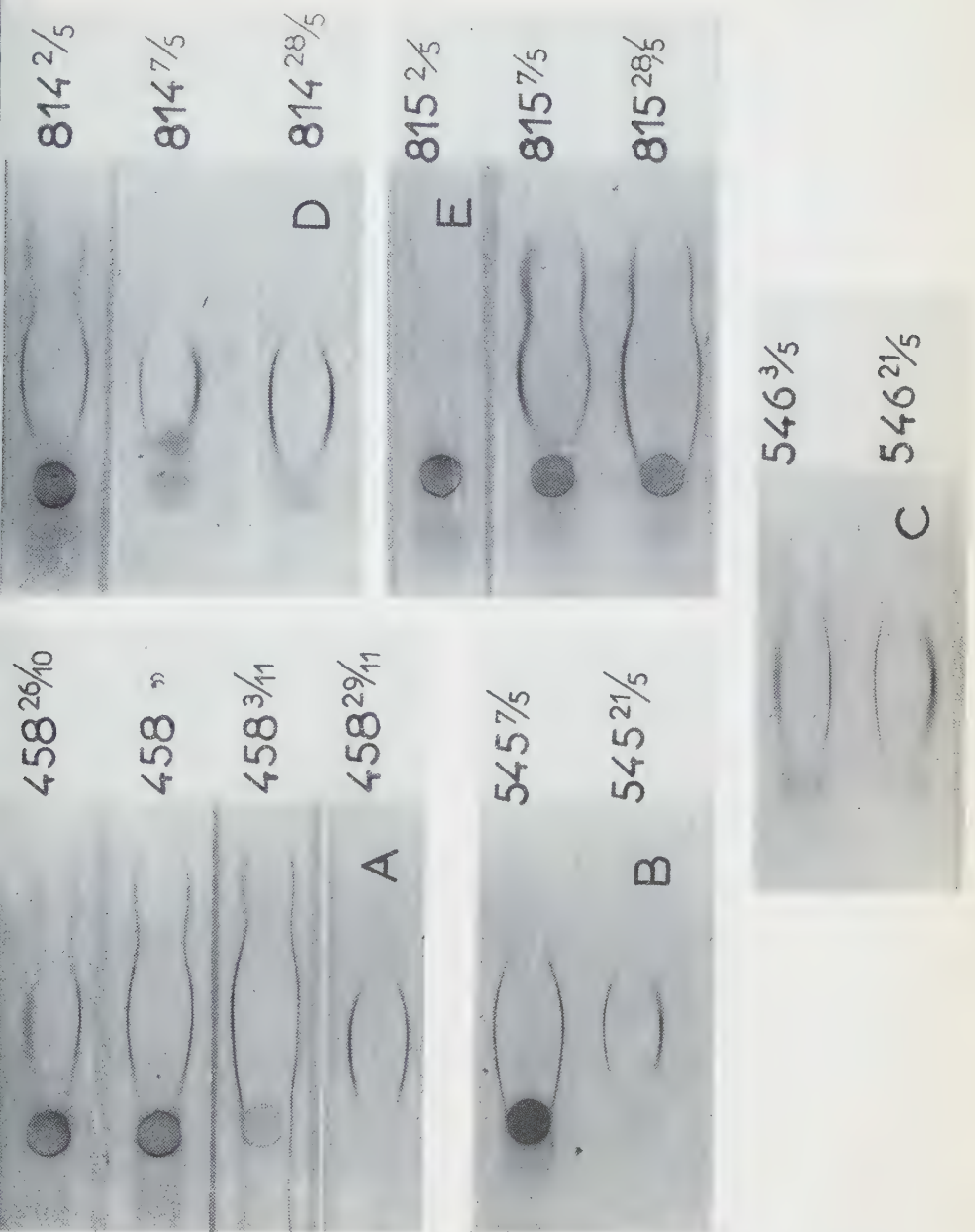


PLANCHE III.



SUMMARY

PREPARATION OF TETANUS ANTITOXIN BY HYPERIMMUNIZATION
OF HORSES WITH A PURIFIED TOXOID.

Horses have been hyperimmunized with purified tetanus toxoid. Some of the horses had an acquired basic immunity (vaccinated horses), the other ones did not have any basic immunity (non-vaccinated horses).

Vaccinated horses presented during hyperimmunization a period with high L+/Lf values (2 to 3); these values dropped towards the end of the hyperimmunization.

Non-vaccinated horses presented L+/Lf values close or very inferior to 1.

Tetanus antitoxin is associated with gamma- and beta-2-globulin serum fractions.

The gamma-antitoxins do not always show high L+/Lf values.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] POPE (C. G.) et STEVENS (M. F.). *Brit. J. exp. Path.*, 1953, **34**, 56.
- [2] RAYNAUD (M.). *The Mechanisms of Hypersensitivity*, Ford Symposium, 1 volume, 1958.
- [3] RELYVELD (E. H.), GIRARD (O.), CORVAZIER (R.), RAYNAUD (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 631.
- [4] RAYNAUD (M.), RELYVELD (E. H.), GIRARD (O.), CORVAZIER (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **96**, 129.
- [5] RELYVELD (E. H.), GRABAR (P.), RAYNAUD (M.) et WILLIAMS (C. A. Jr.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 688.
- [6] HITCHENS (A. P.) et TINGLEY (E. K.). *J. Immunol.*, 1917, **2**, 395.
- [7] SORDELLI (A.). *C. R. Soc. Biol.*, 1921, **85**, 314.
- [8] GLENNY (A. T.) et SÜDMERSEN (H. J.). *J. Hyg.*, 1921, **20**, 176.
- [9] GLENNY (A. T.). *J. Bact.*, 1925, **28**, 241.
- [10] GLENNY (A. T.), POPE (C. G.), WADDINGTON (H.) et WALLACE (U.). *J. Path. Bact.*, 1925, **28**, 481.
- [11] BARR (M.) et GLENNY (A. T.). *J. Hyg.*, 1945, **44**, 135.
- [12] CELAREK (J.) et POREBSKI (W.). *C. R. Soc. Biol.*, 1928, **99**, 1017.
- [13] RAMON (G.) et DESCOMBEY (P.). *C. R. Soc. Biol.*, 1930, **103**, 1202.
- [14] RAMON (G.), DESCOMBEY (P.) et LEMÉTAYER (E.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1931, **46**, 444.
- [15] RAMON (G.) et LEMÉTAYER (E.). *C. R. Soc. Biol.*, 1931, **106**, 21.
- [16] RAMON (G.) et LEMÉTAYER (E.). *C. R. Soc. Biol.*, 1932, **111**, 872.
- [17] RAMON (G.), LEMÉTAYER (E.) et MUSTAFA (A.). *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **124**, 895.
- [18] RAMON (G.), LEMÉTAYER (E.) et NICOL (L.). *C. R. Soc. Biol.*, 1938, **129**, 1067.
- [19] RAMON (G.). *Bull. Mens. Soc. Méd. Hôp. Paris*, 1939, 617.
- [20] RAMON (G.) et RICHOU (R.). *Bull. Acad. Vétér.*, 1945, **48**, 232.

- [21] LEMÉTAYER (E.), NICOL (L.) et GIRARD (O.). *Bull. Acad. Vétér.*, 1945, **18**, 247.
 - [22] RAMSHORST (J. D. van). *Thèse Utrecht*, 1951.
 - [23] RAYNAUD (M.), RELYVELD (E. H.), TURPIN (A.) et MANGALO (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **96**, 60.
 - [24] RAMON (G.) et DESCOMBEY (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1927, **41**, 834.
 - [25] RAYNAUD (M.). *C. R. Acad. Sci.*, 1947, **225**, 543.
 - [26] RAYNAUD (M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, **80**, 356.
 - [27] RAYNAUD (M.) et TURPIN (A.). *C. R. Acad. Sci.*, 1956, **242**, 574.
 - [28] RAYNAUD (M.), TURPIN (A.) et BIZZINI (B.). *Ann. Inst. Pasteur* (à paraître).
 - [29] OAKLEY (C. L.) et FULTHORPE (A. J.). *J. Path. Bact.*, 1953, **65**, 49.
 - [30] GRABAR (P.) et WILLIAMS (C. A. Jr.). *Bioch. Biophys. Acta*, 1953, **10**, 193.
 - [31] *Codex Français*, 7^e édition, 1949, 744.
 - [32] RAMON (G.) et DESCOMBEY (P.). *C. R. Soc. Biol.*, 1926, **95**, 434.
 - [33] RAMON (G.), LEMÉTAYER (E.) et VIRAT (B.). *Rev. Immunol.*, 1944-1945, **9**, 67.
 - [34] RAYNAUD (M.), TURPIN (A.) et RELYVELD (E. H.). *Ann. Inst. Pasteur* (à paraître).
 - [35] RAMON (G.), LEMÉTAYER (E.) et PIROSKY (I.). *C. R. Soc. Biol.*, 1937, **125**, 967.
 - [36] RAMON (G.) et RICHOU (R.). *C. R. Soc. Biol.*, 1941, **135**, 128.
 - [37] RAMON (G.) et RICHOU (R.). *C. R. Soc. Biol.*, 1941, **135**, 1281.
 - [38] CINADER (B.). *Thèse*, 1948.
 - [39] CINADER (B.) et WEITZ (B.). *Nature*, 1950, **166**, 785.
 - [40] CINADER (B.) et WEITZ (B.). *J. Hyg.*, 1953, **51**, 293.
 - [41] KEKWICK (R. A.). *Chem. et Ind.*, 1941, **60**, 486.
 - [42] KEKWICK (R. A.) et RECORD (B. R.). *Brit. J. exp. Path.*, 1941, **22**, 29.
-

SUR LE CARACTÈRE HISTIOCYTAIRE DE L'HISTOPLASMOSE A PETITES FORMES ET LE CARACTÈRE GIGANTO-CELLULAIRE DE L'HISTOPLASMOSE A GRANDES FORMES

par J.-C. LEVADITI, E. DROUHET, G. SEGRETAINE et F. MARIAT (*).

(Institut Pasteur)

Parmi les nombreux types d'altérations tissulaires ou cellulaires qui traduisent les *réactions de l'organisme à l'égard des champignons*, il est des formes où la réaction cellulaire prend ce type de « granulome à corps étranger ». C'est le cas parfois des blastomycoses et toujours de l'histoplasmose.

Les anatomo-pathologistes connaissent bien les *granulomes à corps étranger* appelés aussi par eux « granulomes chroniques de résorption » qui apparaissent autour de substances inoffensives en elles-mêmes, mais insolubles et difficiles ou impossibles à résorber.

Selon la taille, la surface, la forme, la qualité de la substance, qui constitue le corps étranger, on voit le type de réaction cellulaire en cause se modifier. Ainsi les granulomes qui se forment autour des corps étrangers de petite taille sont uniquement histiocytaires, alors que les granulomes de résorption des corps étrangers de grande taille sont giganto-cellulaires.

Histiocytes et cellules géantes sont des cellules de même type par l'aspect de leur noyau et de leur cytoplasme mais dans les cellules géantes tout se passe comme si plusieurs noyaux d'histiocytes étaient contenus dans un protoplasme commun. Ces cellules seraient formées par apposition d'histiocytes qui confondent leur protoplasme et non par multiplication des noyaux dans un même syncytium [1].

Dans l'histoplasmose, le parasite de forme levure se développe à l'intérieur des cellules du système réticulo-endothélial, mais, suivant sa taille, les lésions de l'organisme sont différentes : le granulome de l'histoplasmose à petites formes est histiocytaire

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 8 janvier 1959.

et celui de l'histoplasmose à grandes formes est giganto-cellulaire. L'analyse de ces réactions de l'organisme spontanément atteint et l'étude de l'évolution des lésions expérimentales provoquées chez l'animal nous semblent permettre d'envisager les facteurs conditionnant l'une ou l'autre réaction cellulaire. C'est l'objet du présent travail.

Le *matériel d'étude* à notre disposition est constitué par des coupes de deux cas humains d'histoplasmose à petites formes provenant de la collection du Service de Mycologie, ainsi que de 11 cas humains et 5 simiens d'histoplasmose africaine à grandes formes reçus directement ou provenant des Instituts Pasteur d'Afrique.

Le *matériel expérimental* est constitué principalement par une vingtaine d'animaux (hamsters, souris et cobayes) inoculés avec les souches africaines isolées des cas précédents et dont on étudiait le pouvoir pathogène.

HISTOPLASMOSE A PETITES FORMES.

C'est la plus anciennement connue. Elle est due à *Histoplasma capsulatum* dont le diamètre particulière moyen *in vivo* est de 2 à 3 μ . C'est une forme levure ovale, à surface unie, qui pullule dans le protoplasme des histiocytes et des autres cellules réticulo-endothéliales, transformées en macrophages et dont la taille varie de 15 à 60 μ [2].

L'histoplasmose provoque d'abord l'apparition d'un granulome histiocytaire qui reste inchangé dans les formes localisées (histoplasmome) mais qui, dans les formes graves, se généralise et prend les caractères d'une réticulose diffuse de la rate, du foie, des ganglions et de la moelle osseuse. C'est alors une véritable maladie de système. Les cellules endothéliales des vaisseaux participent alors à ce processus et certains monocytes du sang sont vecteurs d'histoplasmes (1).

Les cellules de ce granulome sont de volumineux histiocytes devenus globuleux et dont le noyau est pourvu d'une chromatine plus abondante qu'à l'état quiescent (fig. 1). Ce noyau est situé à l'un des pôles du cytoplasme qui contient souvent de 20 à 25 et parfois plus de 100 parasites, visibles sur la coupe. Une telle abondance d'éléments dans une même cellule ne peut s'expliquer que par la multiplication intracellulaire du parasite dont le premier élément phagocyté se multiplierait dans la cellule-hôte tou-

(1) Il n'est pas question ici des formes associées à des lésions de tuberculose (Miller), de réticuloses malignes (Rafferty) ou de lymphomes malins (Murray et Brandt), qui posent le problème de la coexistence de l'histoplasmose avec ces affections.

jours vivante, sans jamais faire prendre à la cellule un aspect faussement kystique, ni provoquer la division de son noyau (2).

Ce granulome histiocytaire n'est pas propre à l'histoplasmose à petites formes, car la pullulation des parasites dans les histiocytes qui restent mononucléés se retrouve dans d'autres parasitoses, telle la leishmaniose. Les parasites de ces deux maladies furent même confondus lors de la première description de Darling tant ils se ressemblent. Actuellement, l'absence de blépharo-

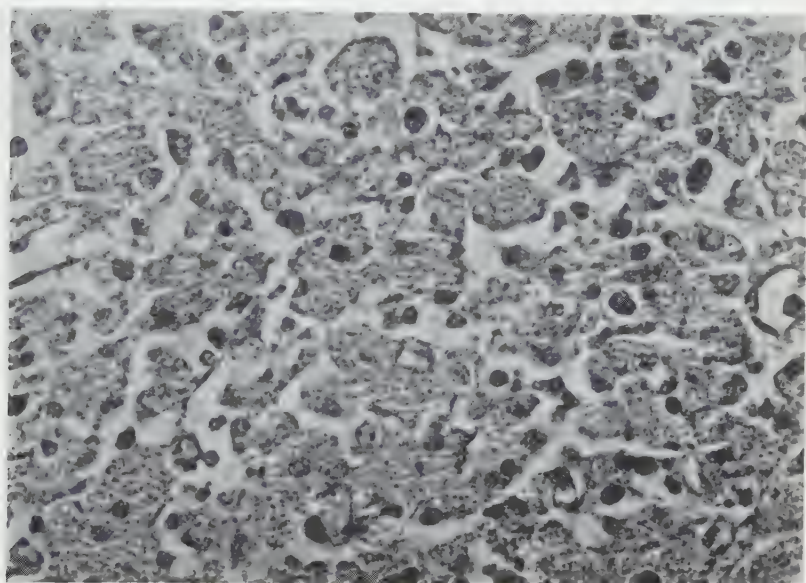


FIG. 1. — Histoplasmose humaine à petites formes. Réaction macrophagique mononucléée, avec une abondance extraordinaire de petites formes intra-cellulaires. Absence de cellules multinucléées. Ex. Mycologie n° 523. Coloration bleu de toluidine ; oc. 6, obj. 40, grand. 520 ×, filtre Wratten 15.

blastés et le caractère PAS (acide periodique-Schiff) positif de l'*Histoplasma capsulatum* permettent de les reconnaître sur coupe.

Le même type de réaction cellulaire s'observe au cours de parasitoses dont les agents pathogènes ont sensiblement les mêmes dimensions : c'est le cas de la *maladie de Chagas*, surtout expérimentale, dans laquelle les parasites se voient dans les coupes de myocarde de la souris, ou encore de la maladie expérimentale

(2) Cet aspect n'est pas propre à la maladie humaine, il se retrouve au cours de l'histoplasmose expérimentale à petites formes de la souris, du rat et surtout du hamster qui se généralise rapidement [3].

du hamster et du rat provoquée par *Penicillium marneffei*. On peut en rapprocher encore certains pseudo-kystes observés au cours de la toxoplasmose ou des pneumopathies mortelles du nourrisson dues à *Pneumocystis carinii* dont les éléments se multiplient eux aussi dans des macrophages extrêmement volumineux mais qui sont toujours mononucléés.

Il est cependant possible de voir dans certaines coupes de bouton d'Orient évoluant depuis un certain temps, parmi les îlots d'histiocytes contenant *Leishmania tropica*, d'occasionnelles cellules géantes contenant elles aussi des parasites. C'est là une exception à la distinction que nous cherchons à établir.

HISTOPLASMOSE A GRANDES FORMES.

A côté de l'histoplasmose classique à petites formes, une nouvelle variété d'histoplasmose à grandes levures, mesurant de 6 à 15 μ de diamètre, a été observée en Afrique pour la première fois par Catanei et Kervran en 1945 [4]; Vanbreuseghem l'a individualisée sous le nom d'histoplasmose africaine en 1952 [8, 9].

Depuis la première description, de nombreux cas ont été décrits [5, 6, 7]. On peut souligner celui observé par Bablet, Jonchère et Martin la localisation hépatique y est prédominante et toute la trame kupfférienne est bourrée d'histoplasmes levuriformes ovoïdes de 6 à 14 μ de diamètre. Sur les coupes, la plupart de ces éléments sont présents dans des plasmodés des sinusoides ou des espaces portes.

De telles lésions ont été retrouvées en Afrique Equatoriale par Audebaud, Depoux et Merveille [40] à propos de deux cas d'histoplasmose à grandes formes observés par eux à Brazzaville, pour lesquels ils ont constaté le même caractère plasmodial de la lésion histologique au cours de la maladie expérimentale du cobaye et de la souris. Dernièrement, Camain et coll. [41] ont réuni 7 observations nouvelles d'histoplasmose humaine en A. O. F. dont 6 à grandes formes et une à formes intermédiaires.

Enfin, avec G. Courtois, nous avons retrouvé les mêmes formes et la même structure plasmodiale de la réaction cellulaire dans 5 cas d'histoplasmose observés chez des *Cynocephalus babuin* en captivité, originaires de Guinée [42, 43]. Ces lésions histologiques, de forme nodulaire, à prédominance dermique, peuvent servir de type de description.

La lésion réalise un granulome à corps étranger peu vascularisé, constitué principalement de plasmodés contenant de nombreuses formes levures arrondies ou ovalaires refoulant les noyaux à la périphérie.

Entre ces plasmodés, parfois accompagnés d'histiocytes parasités, il existe une infiltration séreuse ou séro-fibrineuse contenant

d'assez nombreux polynucléaires qui peuvent pénétrer les plasmodies et réaliser des zones de nécrose purulente où les formes levures sont à l'état libre.

Ces plasmodies arrondis ou encochés ont de fines anastomoses protoplasmiques et possèdent sur coupe jusqu'à 20 noyaux, irrégulièrement répartis, mais le plus souvent périphériques. Leur protoplasme, finement grenu et fortement éosinophile, contient en nombres très variés des formes levures ou même des débris

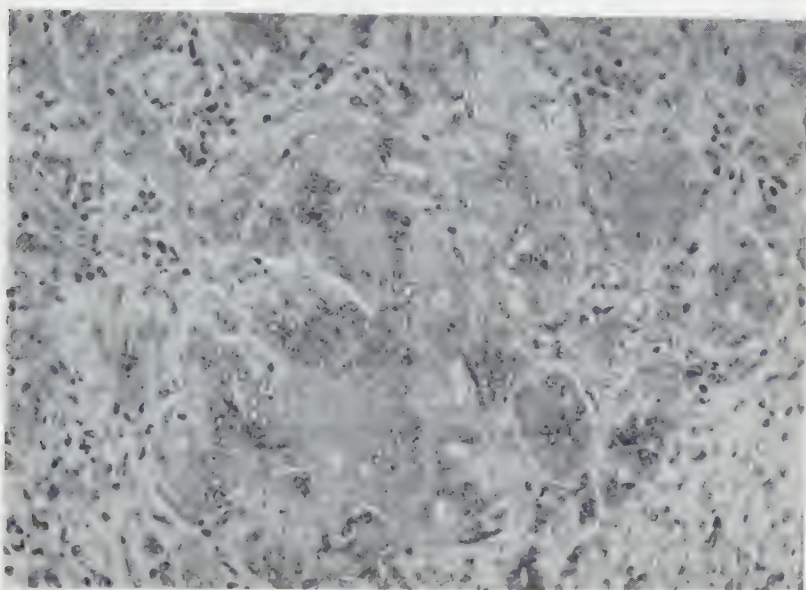


FIG. 2. — Histoplasmosé humaine africaine à grandes formes ; coupe de granulome à corps étranger. Un groupe de plasmodies englobé de fibrose ne contient qu'un petit nombre de formes levures visibles dans le protoplasme. Ex. n° W. 1590. Coloration hémalum-éosine-safran ; oc. 6, obj. 23, grand. 260 $\times$, filtre Wratten 15.

de cellules inflammatoires nécrosées. Les parasites, ovalaires, encapsulés, ont de 8 à 10 μ de diamètre et nous en avons compté jusqu'à 80 sur une coupe de cellule, ce qui laisse songeur sur le nombre réel que pouvait contenir la cellule entière.

Il arrive que, malgré l'existence de nombreux noyaux et d'une volumineuse masse protoplasmique, certaines cellules géantes ne contiennent qu'une ou deux formes levures. Ce fait paraît important car il suggère que ni le grand nombre d'éléments, ni l'importance du volume total de substances étrangères à la cellule ne conditionnent le caractère multinucléé de celle-ci (fig. 2).

Comme il a été relevé pour l'histoplasmosse à petites formes, on peut noter à côté de la réaction régulièrement giganto-cellulaire de l'histoplasmosse à grandes formes le caractère *accidentellement* plasmodial non folliculaire d'autres mycoses. *Blastomyces dermatitidis*, de 4 à 18 μ de diamètre, se rencontre dans des plasmodies, de même que *Coccidioides immitis*, dont les formes rondes, de 20 à 60 μ de diamètre, sont parfois contenues, à l'état isolé, dans des plasmodies de 10 à 15 noyaux ou même plus, et dont un exemple frappant existe dans le traité d'Anatomie pathologique d'Anderson (p. 27, fig. 21). Là encore on est conduit à penser que c'est bien le diamètre de l'élément étranger qui conditionne le caractère uni- ou multinucléé de la cellule hôte. Du point de vue immunologique nos recherches en cours montrent que l'allergie à l'histoplasmine est commune aux deux formes.

En conclusion de ces observations sur l'histoplasmosse spontanée, on peut envisager l'hypothèse que dans cette affection comme dans d'autres parasitoses, les dimensions du parasite pourraient conditionner la réaction cellulaire ; un parasite petit provoquerait une réaction histiocytaire, un plus volumineux parasite, une réaction plasmodiale.

Les réactions provoquées chez l'animal par l'inoculation d'histoplasmes africains à grandes formes vont appuyer cette hypothèse.

HISTOPLASMOSE AFRICAINE EXPÉRIMENTALE.

Le fait sur lequel il faut insister ici, c'est l'étude expérimentale de l'histoplasmosse africaine, au cours de laquelle on observe successivement de petites puis de grandes formes. L'étude des lésions histopathologiques révèle que la réaction cellulaire varie dans le temps selon le diamètre de l'élément levuriforme : elle est histiocytaire dans les formes aiguës et en présence de petites formes, et giganto-cellulaire dans les zones à grandes formes qui caractérisent les formes chroniques [7, 11]. Ce dimorphisme du parasite fut observé pour la première fois par Catanei en 1945, puis a été retrouvé par de nombreux auteurs dont Dubois et Vanbreuseghem [8], Drouhet et Schwarz [14], Drouhet [7], Audebaud, Merveille et Depoux [10] et dernièrement par Camain et coll. en 1958 [11].

La même souche se développe ici dans le même organisme sous deux formes différentes qui se succèdent.

C'est au début, ou dans les formes aiguës de la maladie, que se rencontrent des petites formes levures, ainsi que des cellules mononucléées, et tardivement, après une évolution de deux mois ou plus, que grandes formes et cellules géantes deviennent plus nombreuses.

Au cours d'un envahissement ganglionnaire tardif, on a constaté, chez un cobaye inoculé depuis onze mois avec une souche d'histoplasme à grandes formes, l'existence de plasmodes tout le long du bord de la lésion, au contact du tissu lymphoïde encore sain, sans petites formes ou macrophages intermédiaires (fig. 3).

Mais les lésions expérimentales de quelques espèces animales

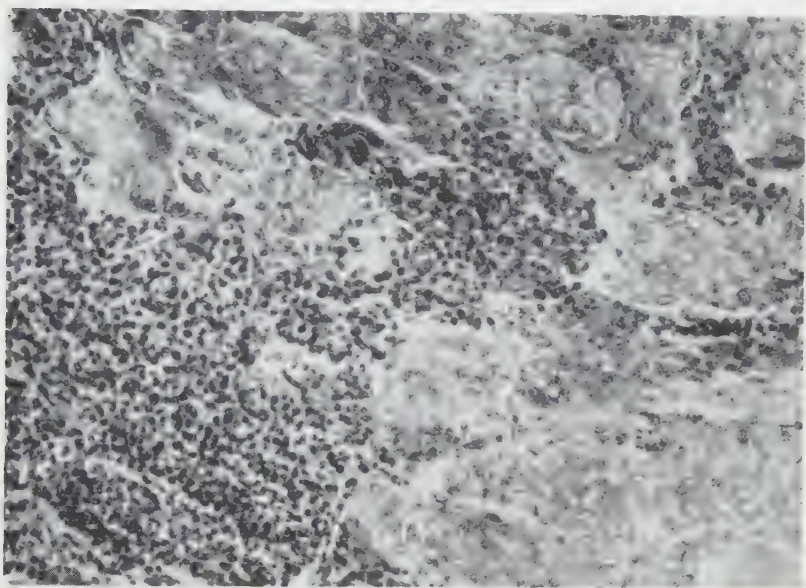


FIG. 3. — Histoplasmosse à grandes formes, maladie expérimentale du cobaye. Souche Brazzaville. Le foyer métastatique intra-ganglionnaire est d'emblée plasmodial. Il se trouve au contact direct du tissu lymphoïde encore normal. Pas de réaction macrophagique ou histiocytaire intermédiaire. Ex. n° W. 1825. Mêmes caractéristiques que la figure 2.

offrent certaines particularités : il y a une différence de comportement entre la souris et le hamster.

Au cours de cette histoplasmosse expérimentale de la souris, la réticulose initiale comporte, parmi d'abondants plasmodes contenant des grandes formes, quelques macrophages dispersés contenant également une ou deux grandes formes (Y. 2755).

Les lésions tardives de la souris sont aussi plus souvent nécrosantes ou suppurées que celles des autres espèces animales, mais on y retrouve régulièrement la réaction plasmodiale de l'histoplasmosse à grandes formes (W. 1827). Par contre, chez le

hamster, la réponse cellulaire est toujours conforme à la description donnée plus haut.

Enfin, il existe une autre particularité, qui est le propre de la souche isolée chez le Cynocéphale, lorsqu'elle est inoculée au hamster. Injectée dans le péritoine, elle détermine une réaction plasmodiale. Tardivement, à côté des grandes formes situées dans des *cellules géantes*, on trouve des formes intermédiaires de $6\ \mu$

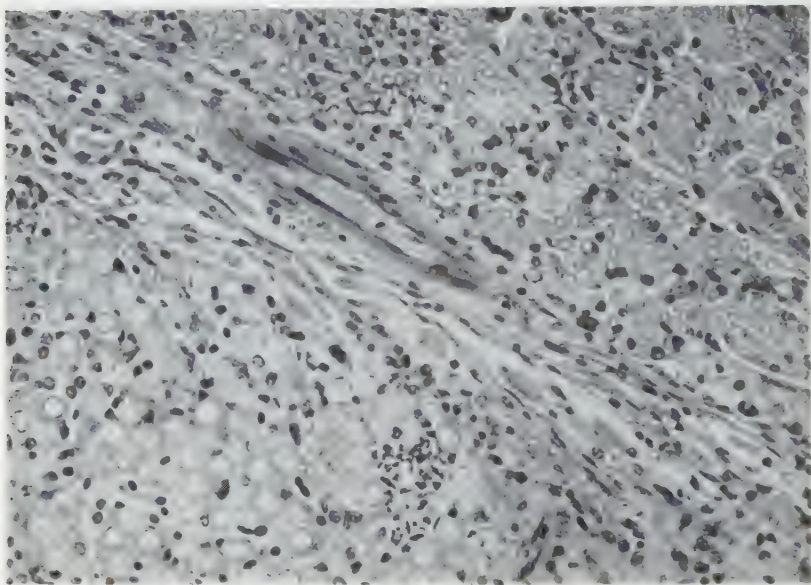


FIG. 4. — Souche d'histoplasmose du singe africain, inoculée au hamster par voie péritonéale. Animal sacrifié après dix-sept mois d'observation. Lésion du testicule et de la vaginale. Dans le testicule les canaux spermatiques ont disparu remplacés par un granulome giganto-cellulaire contenant en abondance de grandes formes levures. De l'autre côté d'un vaisseau la zone d'extension récente est riche en formes moyennes fortement réfringentes. La lésion est alors constituée de plasmodes et de rares macrophages. Ex. Mycologie n° 933. Mêmes caractéristiques que la figure 2.

de diamètre moyen (de 4 à $8\ \mu$ environ). Toutes sont pratiquement contenues dans des plasmodes, les histiocytes étant l'exception (fig. 4).

On voit donc que, malgré quelques variations individuelles, les lésions de l'histoplasmose expérimentale sont en accord avec celles de l'histoplasmose spontanée. Mais elles peuvent réaliser dans un même organisme la double réaction plasmodiale ou mononucléée selon la dualité de forme du parasite d'une même souche.

CONCLUSION.

Au cours de l'histoplasmosse spontanée ou expérimentale, malgré les variations individuelles inhérentes à toute inflammation, la réaction cellulaire tend à affecter le plus souvent l'aspect d'une réticulose ou d'un granulome à corps étranger.

De tels granulomes, qu'ils soient histiocytaïres ou giganto-cellulaires, s'observent dans les lésions humaines ou expérimentales, mais la différence de leurs cellules paraît conditionnée par l'inégalité de taille des parasites.

A l'histoplasmosse à petites formes correspond une réaction cellulaire de type histiocytaire, à l'histoplasmosse à grandes formes correspond une réponse giganto-cellulaire.

Expérimentalement, lorsqu'il s'agit d'une souche africaine à grandes formes, les deux peuvent se succéder : la réponse est histiocytaire ou giganto-cellulaire selon le diamètre des corps levuriformes.

Ce résultat reste en accord avec l'ensemble des données de la physiologie des histiocytes ; il fait penser que, dans les limites de nos connaissances actuelles, et pour les éléments dépourvus de cytotoxicité, la réponse giganto-cellulaire est conditionnée par la taille des parasites et cela quel que soit l'organisme ou l'organe qui les héberge.

SUMMARY

HISTIOCYTES REACTION IN « SMALL FORMS » HISTOPLASMOSIS,
AND GIANT CELLS REACTION IN « LARGE FORMS » HISTOPLASMOSIS.

In the course of spontaneous or experimental histoplasmosis and in spite of any individual variation, the cellular reaction is most often of a foreign body granuloma type.

Such granulomas appear in human or experimental lesions, but the difference between histiocytes and giant cells granulomas seems to be due to the differences in size of the parasites.

When histoplasmosis is induced by small-cell yeasts, the cells of the granuloma are histiocytes ; when it is induced by large-cell yeasts, the granuloma is constituted by giant cells.

In experimental infections with African large-cell yeasts, both reactions can be successively observed : histiocytes or giant cells appear according to the diameter of the parasites.

These findings agree with data on the physiology of histiocytes. They suggest that the cellular reaction depends upon the parasites size, whichever organ or organism they develop in.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] LEWIS (W. H.). *The Harvey Lectures*, 1927, **21**, 77.
 - [2] BINFORD (C. H.). *Amer. J. clin. Path.*, 1955, **25**, 25.
 - [3] DROUHET (E.) et SEGRETAIN (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **83**, 381.
 - [4] CATANEI (A.) et KERVAN (P.). *Arch. Inst. Pasteur Algérie*, 1945, **23**, 169.
 - [5] KERVAN (P.) et ARETAS (R.). *Bull. Soc. Path. exot.*, 1947, **40**, 270.
 - [6] BABLET (J.), JONCHÈRE (H.) et MARTIN (M.). *Presse méd.*, 1949, **57**, 1237.
 - [7] DROUHET (E.). *Sem. Hôp. Paris, Pathol. et Biol.*, 1957, n° 5, 1299.
 - [8] DUBOIS (A.), JANSSENS (P. G.), BRUTSAERT (P.) et VANBREUSEGHEM (R.). *Ann. Soc. Belge Med. trop.*, 1952, **32**, 569.
 - [9] VANBREUSEGHEM (R.). *Mycologia*, 1956, **48**, 264.
 - [10] AUDEBAUD (G.), MERVEILLE (P.), LALUQUE (P.) et DEPOUX (R.). *Bull. Soc. Path. exot.*, 1954, **47**, 803.
 - [11] CAMAIN (R.), BERTÉ (M.), KLEFSTAD-SILLONVILLE (F.), MAFART-VILASCO (J. A.) et DROUHET (E.). *Bull. Soc. Path. exot.*, 1958, **51**, 83.
 - [12] COURTOIS (G.), SEGRETAIN (G.), MARIAT (F.) et LEVADITI (J.-C.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 124.
 - [13] MARIAT (F.) et SEGRETAIN (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 874.
 - [14] DROUHET (E.) et SCHWARZ (J.). *J. Lab. clin. Med.*, 1956, **47**, 128.
 - [15] SCHWARZ (J.) et DROUHET (E.). *Arch. Path.*, 1957, **64**, 409.
 - [16] DUNCAN (J. T.). *Trans. Roy. Soc. trop. Med.*, 1958, **52**, 468.
-

POUVOIR PATHOGÈNE EXPÉRIMENTAL D'UNE SOUCHE D'*HISTOPLASMA CAPSULATUM* ISOLÉE DU SINGE AFRICAIN

par F. MARIAT et W. E. GARDINI-TUESTA (*) (**)

(avec la collaboration technique de J. SATRE).

(Institut Pasteur, Service de Mycologie
et de Physiologie Végétale)

L'histoplasmose spontanée du singe africain (*Cynocephalus babuin*) due à une souche particulière d'*Histoplasma capsulatum*, a été décrite pour la première fois en 1955 [1]. Dans les lésions, de très nombreuses levures bourgeonnantes, intracellulaires, sont observées. Ces mêmes levures figurent dans le pus qui sourd des abcès. Cependant, malgré la présence de nombreuses cellules fongiques dans les produits pathologiques, c'est avec de très grandes difficultés que l'agent causal a pu être isolé [2]. Le champignon présente en culture les caractères botaniques de l'espèce *H. capsulatum*, à savoir : mycélium cloisonné, microspores, chlamydospores échinulées, mais il s'en éloigne par diverses propriétés secondaires. Ce microorganisme, classé provisoirement dans l'espèce *H. capsulatum*, se rapproche, par la grande dimension de ses formes parasitaires ($\pm 8-10 \mu$ de diamètre) de l'agent de l'histoplasmose africaine auquel Vanbreuseghem a donné le nom d'*Histoplasma duboisii* [3].

Outre la lenteur extrême du développement en culture de la souche « singe » d'*H. capsulatum*, la faible intensité du pouvoir pathogène la caractérisait. Des expériences préliminaires montraient en effet que ce pouvoir pathogène est nettement inférieur à celui de la plupart des souches d'*Histoplasma* étudiées, que ce soit des souches à petites ou à grandes formes levures parasitaires. Nous avons réuni de nouvelles informations sur ce problème, ce sont celles-ci que nous rapportons ci-dessous.

De longs délais ont été imposés par la lenteur des expériences, certaines d'entre elles s'étendant sur trois années. Il nous a été

(*) Boursier du Gouvernement français en 1956-1957. Adresse actuelle : Universidad Nacional San Agustín, Facultad de Medicina, Arequipa, Pérou.

(**) Société de Microbiologie, séance du 5 février 1959.

possible pendant ce temps, non seulement de suivre l'expérimentation en cours sur cobayes, hamsters et souris, mais également d'observer deux nouveaux cas spontanés chez le singe. Nous rendons compte tout d'abord de ces deux dernières observations avant de relater les résultats des infections expérimentales.

D'une façon générale, le champignon a été recherché dans les organismes parasités, d'une part en cultivant les divers organes, d'autre part en examinant des coupes de ces derniers, colorées par des techniques de choix (hématéine-éosine-safran et acide periodique-Schiff).

SINGES.

Le nombre de singes atteints spontanément d'histoplasmose et observés à Paris est maintenant de sept. Les deux animaux observés depuis notre précédent mémoire sont morts peu de temps (dix jours et quarante-huit jours) après leur arrivée de Kindia. Comme pour les précédents, l'histoplasmose ne semble pas être la cause première de la mort. Ce sont toujours des animaux cachectiques, affaiblis, abondamment parasités (trichocéphales et filaires). La maladie fongique se manifeste par des lésions cutanées plus ou moins nombreuses, plus ou moins ulcérées ; dans le pus comme dans les lésions on trouve en abondance les levures caractéristiques de grandes dimensions et à parois épaisses. A l'autopsie, on note seulement une hypertrophie des ganglions axillaires et inguinaux, ainsi que de quelques ganglions mésentériques. On note également de rares adhérences au niveau du foie et des poumons.

L'examen des coupes d'organes montre chez l'un de ces singes (n° 6-1066) la présence de levures dans les lésions cutanées, les ganglions inguinaux et axillaires. Dans le foie, de rares levures sont visibles, coexistant avec des trichocéphales. La présence de champignons dans cet organe doit être soulignée : c'est le seul parmi les sept singes observés à en présenter. Chez l'autre singe (7-2042) seules les lésions cutanées renferment des éléments fongiques.

COBAYES.

Plusieurs séries de ces animaux ont été inoculées et suivies.

1° Trois cobayes sont inoculés par voie intratesticulaire avec 0,2 ou 0,4 cm³ de pus provenant d'un abcès non fistulisé de singe. Dès le troisième mois, on observe une orchite unilatérale n'affectant nullement l'état général des animaux.

Deux de ces cobayes sont sacrifiés six et neuf mois après l'inoculation. A l'autopsie, l'orchite mise à part, aucun aspect anormal n'est noté. Les frottis et les coupes de testicules des deux animaux

montrent la présence de très nombreuses grandes formes levures. Des fragments de testicule mis en culture donnent naissance, en deux mois, à des colonies d'*Histoplasma*. Les viscères des deux cobayes apparaissent sains ; cependant, la mise en culture de fragments de rate de l'animal, sacrifié après six mois, donne en trois mois des colonies d'*H. capsulatum*. Pourtant, les coupes de ce même organe ne contiennent pas d'éléments fongiques.

Aucun des autres organes des deux cobayes ne s'est révélé positif, ni par culture, ni à l'examen histologique.

L'animal restant en vie présente un état général excellent. L'énorme orchite s'ulcère après un prélèvement effectué à la



FIG. 1. — Cobaye inoculé par voie intratesticulaire et photographié trente mois après l'inoculation (n° 2045). On peut noter des lésions cutanées et sous-cutanées au niveau des oreilles, des pattes et du museau.

seringue dans lequel on observe de nombreuses levures. Vingt-cinq mois après l'inoculation, apparaissent des lésions cutanées au niveau des oreilles. Deux mois plus tard, d'importantes lésions sèches se développent sur les pattes et sur le museau. Sur le museau, les lésions s'accroissent avec le temps et forment des nodosités surélevées, croûteuses, sèches, de 10 à 12 mm de hauteur (fig. 1). L'animal ne semble pas souffrir. Trente-sept mois après l'inoculation, l'animal meurt, cachectique, couvert de parasites animaux. Les lésions du museau et des pattes (celles-ci rappellent, toutes proportions gardées, les lésions spontanées du singe) sont très grandes et atteignent 15 à 20 mm de hauteur.

L'autopsie ne montre aucune atteinte des organes profonds. A l'examen des coupes de tissus on ne trouve de levures que

dans le testicule et dans les lésions cutanées. Le foie, la rate, le rein et les poumons n'en contiennent pas (n° 2045). Il semble que cet animal qui, tout au long de sa vie, n'a pas paru souffrir de son histoplasmose, soit tout simplement mort de vieillesse.

2° Trois cobayes sont inoculés par voie intratesticulaire avec 0,2 ou 0,4 cm³ de suspension de la phase filamenteuse du champignon. L'animal, qui a reçu 0,4 cm³, est mort trois mois après l'inoculation, mais d'une affection bactérienne. De tous les organes, seuls les testicules permettent d'obtenir des cultures positives. L'examen histologique des divers organes, testicules compris, ne révèle aucune trace d'éléments fongiques.

Les deux cobayes inoculés avec 0,2 cm³ sont sacrifiés après treize mois. Ils présentent une petite orchite. A l'examen des coupes d'organes, on trouve un grand nombre de levures dans les testicules mais également quelques levures dans le poumon (n° 2012).

3° Deux cobayes sont inoculés par voie intrapéritonéale avec 1 cm³ de la phase filamenteuse du champignon étudié. Ces animaux sont sacrifiés après treize mois. Macroscopiquement,

LÉGENDE DE LA PLANCHE

FIG. 1. — Chlamydospore échinulée d'*H. capsulatum* souche « singe », observée dans les tissus du testicule d'un cobaye sacrifié vingt et un jours après son inoculation intratesticulaire.

FIG. 2. — Coupe de rate d'un hamster (n° 1043) mort vingt-deux mois après son inoculation intrapéritonéale (coloration acide periodique-Schiff, $\times 610$). Les plasmodes contiennent des levures rondes ou ovalaires, contenant des inclusions mises en évidence par la coloration.

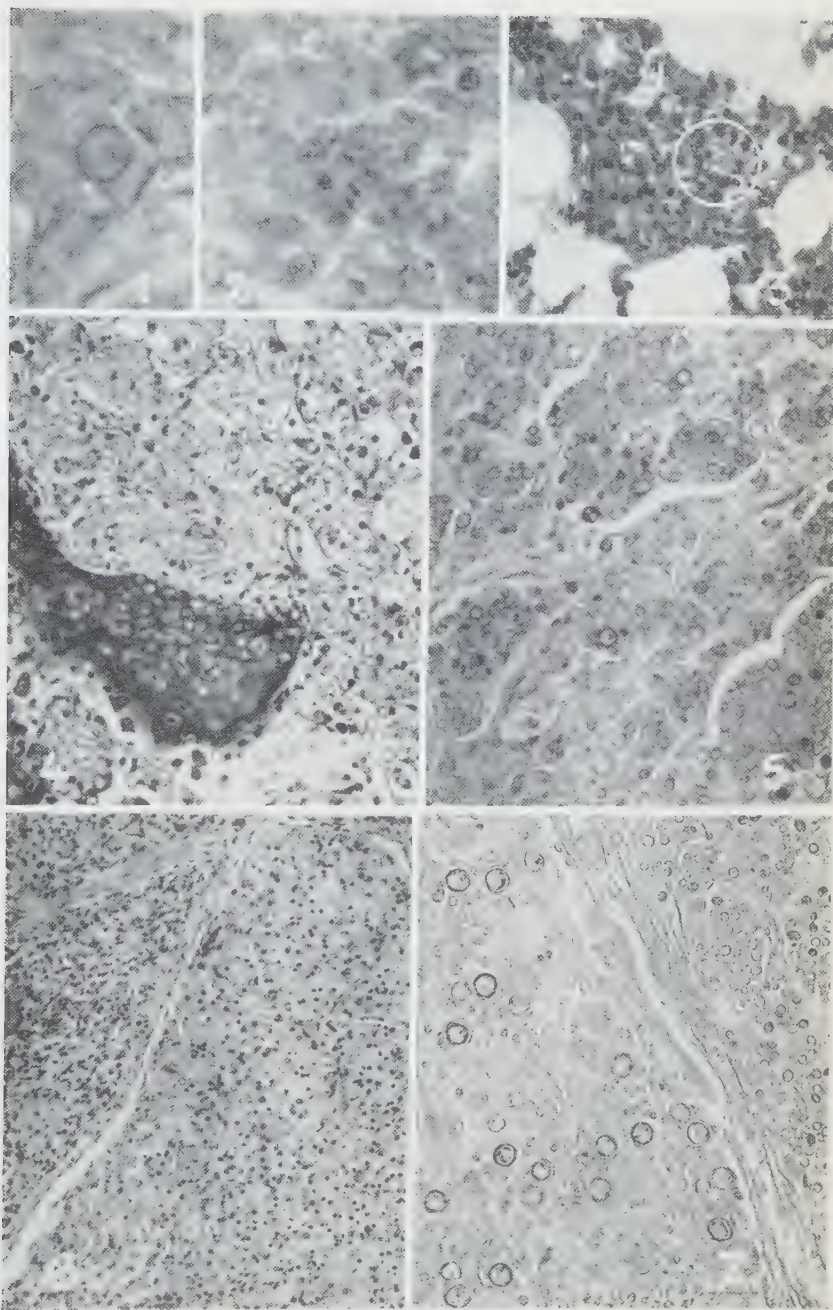
FIG. 3. — Coupe de poumon d'un hamster (n° 933) mort dix-sept mois après l'inoculation intrapéritonéale (hémalum, $\times 260$). Le cercle précise la position des levures.

FIG. 4. — Coupe de patte de hamster (n° 1086) colorée par l'hématéine-éosine-safran ($\times 200$). Le granulome plasmodial, avec un nombre très élevé de formes levures, envahit les divers tissus dont les os et la moelle osseuse.

FIG. 5. — Coupe de testicule de hamster (n° 1086) colorée par l'acide periodique-Schiff ($\times 260$). On peut noter les dimensions variables des formes levures ($5,7 \times 4,6 \mu$ en moyenne).

FIG. 6. — Coupe de rate (hamster mort dix-sept mois après inoculation intrapéritonéale) colorée par l'hémalum ($\times 135$). On note la présence d'innombrables levures de dimensions moyennes et fortement réfringentes (n° 933).

FIG. 7. — Coupe de testicule (même animal que fig. 6) colorée par l'acide periodique-Schiff ($\times 260$). Deux plages de levures sont visibles, l'une contient des éléments réfringents de petites dimensions ($5,1 \times 3,8 \mu$ en moyenne), l'autre des éléments nettement plus grands ($11,2 \times 10 \mu$ en moyenne). [Photographies J. Grzelak.]





à l'autopsie, on ne remarque qu'une orchite. L'examen histologique montre de très nombreuses levures dans les testicules et de rares éléments fongiques dans le foie et dans le poumon (n° 2023).

4° Huit cobayes sont inoculés par voie intratesticulaire avec 0,3 cm³ de la phase filamenteuse du champignon. Les animaux sont sacrifiés huit, quinze et vingt et un jours après l'inoculation. Lors des autopsies, on ne note aucune anomalie. Pour chaque animal, les divers organes sont mis en culture. Les fragments de testicules donnent dans tous les cas une rétroculture, en revanche, aucun des autres organes n'a jamais donné de culture.

L'examen histologique n'est pratiqué que sur les testicules inoculés. On n'y trouve pas de formes levures du champignon, mais dans les coupes de deux des animaux (sacrifiés respectivement quinze et vingt et un jours après l'inoculation), on remarque une chlamydospore échinulée (pl., fig. 1) provenant sans doute de l'inoculum même. Les chlamydospores peuvent expliquer les cultures positives obtenues à partir de fragments de testicules.

HAMSTERS.

Cet animal s'est montré à plusieurs reprises très favorable à l'étude des mycoses. Il s'est également révélé excellent pour l'expérimentation de la souche « singe » d'*Histoplasma capsulatum*.

1° Un hamster reçoit 0,5 cm³ de pus de singe par voie intrapéritonéale. Il est mort trente et un mois après l'inoculation. Bien que rien d'anormal ne soit constaté à l'autopsie, la rétroculture à partir des testicules est positive et on voit dans les coupes de cet organe de grandes formes levures.

2° Deux hamsters sont inoculés par voie intratesticulaire avec 0,2 cm³ de la phase filamenteuse. Pendant de longs mois ils présentent un excellent état général. L'un des animaux meurt après vingt mois, mais d'une affection bactérienne. On ne peut mettre en évidence d'histoplasmes ni par culture d'organe, ni par histologie.

Le second animal est sacrifié après le même délai de vingt mois ; sa santé paraît excellente. A l'autopsie on note une orchite et quelques rares nodules sur les poumons. Les rétrocultures effectuées à partir des testicules sont positives. On obtient également quelques rares colonies d'*Histoplasma* à partir de fragments de rate. Les cultures des autres organes sont négatives. A l'examen des coupes d'organes, on note la présence de levures dans le seul testicule ; aucune cellule fongique ailleurs.

3° Quinze hamsters sont inoculés par voie péritonéale avec la phase filamenteuse du champignon et sacrifiés par lots de trois animaux après deux, cinq, huit, quinze et quatre-vingt-quatorze jours. Les foies et rates de tous ces animaux sont mis en culture et examinés sur coupe histologique.

Les fragments d'organes des animaux sacrifiés après deux, cinq et huit jours donnent en rétroculture de nombreuses colonies d'*Histoplasma* ; ceux des animaux sacrifiés après quinze jours donnent des colonies bien moins nombreuses ; enfin, les organes des animaux sacrifiés après quatre-vingt-quatorze jours ne donnent aucune culture. Dans aucun de ces cas, il n'a été possible de détecter de formes fongiques à l'examen des coupes d'organes. Il semble donc que ce soit là encore le reliquat de l'inoculum lui-même qui donne les cultures positives.

4° Cinq hamsters reçoivent 0,5 cm³ de suspension de la forme filamenteuse du champignon par voie intrapéritonéale. Un de ces animaux est mort dix-sept mois après l'inoculation. A l'autopsie, il présente une orchite et une congestion du foie, de la rate et des poumons. Les rétrocultures de foie, de rate, de poumon et de testicules sont positives. L'examen des coupes (n° 933) révèle la présence de nombreuses formes fongiques dans le testicule, le foie, la rate et les poumons. Dans le testicule on note la coexistence déjà mentionnée par ailleurs [4] de deux plages contenant l'une des formes levures de grandes dimensions (11,20 μ $\times$ 9,90 μ) dans un granulome giganto-cellulaire et l'autre des formes de dimensions nettement inférieures (5,1 $\times$ 3,8 μ). Ce hamster est sans doute le premier animal qui soit mort de l'histoplasmose expérimentalement provoquée par la souche « singe » d'*Histoplasma capsulatum* (pl., fig. 3, 6 et 7).

Deux autres animaux de la même série sont sacrifiés vingt et un mois après l'inoculation. L'un de ces hamsters ne présente aucune lésion et les cultures, comme l'examen des coupes, sont négatifs. L'autre hamster montre à l'autopsie un kyste et deux nodules ganglionnaires sur le mésentère. Tous les autres organes paraissent normaux. L'examen des coupes montre la présence de levures dans le pancréas et les nodules mésentériques. Ces derniers servent de point de départ à une expérimentation sur le hamster que nous relatons ci-dessous (§ 5).

Le quatrième hamster est mort vingt-deux mois après son inoculation et, semble-t-il, également d'histoplasmose expérimentale. C'est une femelle qui présente à l'autopsie comme unique anomalie, un nodule ovarien dont la taille atteint 1 cm. Ce nodule contient un pus blanchâtre renfermant de nombreuses grandes formes levures. L'examen de coupes d'organes (n° 1043) révèle la présence de levures dans le nodule ovarien. Dans le foie, les formes levures sont rares, dispersées et de taille moyenne

($5,6 \times 4,10 \mu$) ; dans la rate et les poumons, elles sont de taille variable ($\pm 6 \times 5 \mu$) et également dispersées (pl., fig. 2).

Le cinquième hamster de la série est mort trente mois après l'inoculation. A l'autopsie on note une orchite, un foie granuleux et des poumons hémorragiques. L'examen histologique des organes montre de nombreuses grandes formes fongiques dans les testicules ainsi que des éléments levures bien plus rares dans le foie, la rate et les poumons.

5° Quatre hamsters sont inoculés par voie intrapéritonéale avec un broyat de nodules mésentériques provenant de l'un des animaux de la série précédente. Un des animaux est mort après huit mois. L'examen des organes révèle la présence d'histoplasmes dans les testicules et dans le foie (n° 1065).

Deux autres hamsters sont sacrifiés onze mois après l'inoculation. A l'autopsie, hormis une orchite, on ne note aucune anomalie apparente. Chez ces deux animaux, un fait est remarquable, c'est la présence de gommages déformantes sur les pattes ; ces lésions peuvent se comparer à celles que l'on voit se produire au cours de la sporotrichose expérimentale du hamster [5].

L'examen histologique des coupes d'organes montre des levures en plus ou moins grand nombre dans le foie, la rate, les poumons et les testicules (pl., fig. 5). Dans ces derniers, les grandes formes du champignon sont très nombreuses. Dans les pattes, on observe un granulome plasmodial suppuré, non nécrosé, contenant de très nombreuses formes levures (pl., fig. 4). Celles-ci envahissent non seulement le tissu épidermique mais également certains os, et la moelle osseuse est détruite (n° 1086, 1087 et 1091).

Un dernier hamster enfin est mort quatorze mois après l'inoculation. Il présente des lésions sur le museau. A l'autopsie on note des lésions abdominales. L'examen histologique permet de mettre en évidence quelques levures dans le foie et dans la rate.

SOURIS.

1° Douze souris reçoivent par voie intraveineuse environ 3/10 de centimètre cube de suspension de champignons. Les animaux sont successivement sacrifiés deux, cinq, huit, quinze et trente jours après l'inoculation ; aucune mortalité spontanée n'est observée. Pour chaque animal, des fragments de foie et de rate sont mis en culture et ces mêmes organes sont examinés histologiquement. Les cultures sont positives dans 10 cas sur 12 ; les deux souris négatives ont été sacrifiées respectivement après quinze et trente jours. Les organes d'une souris sacrifiée après trente jours ne donnent naissance qu'à de rares colonies d'*Histoplasma*.

Dans aucun cas on ne trouve de formes levures à l'examen his-

tologique des organes. La seule trace du champignon que l'on y décèle, ce sont des filaments, extérieurs aux tissus hépatiques de l'une des souris sacrifiées après deux jours. Ce doit être là un fragment de l'inoculum lui-même (n° 708 c).

2° Quinze souris sont inoculées par voie intrapéritonéale avec 0,5 cm³ de suspension du champignon. Les animaux sont sacrifiés après deux, cinq, huit et quatre-vingt-seize jours sans qu'aucune mortalité spontanée soit notée. Les cultures de fragments de foie et de rate ne sont positives que pour les animaux sacrifiés après deux, cinq et huit jours. Les quatre souris sacrifiées après quatre-vingt-seize jours ne donnent que des cultures négatives. Dans aucun cas, on ne peut mettre en évidence de formes fongiques, sur coupe de foie ou de rate.

CONCLUSIONS.

Ces expériences confirment le pouvoir pathogène réduit de la souche d'*Histoplasma capsulatum* isolée du singe africain, déjà signalé par Mariat et Segretain [2].

Dans la maladie spontanée, les singes ne présentent que des lésions sous-cutanées avec attaque des os sous-jacents.

Les animaux expérimentalement inoculés gardent le plus souvent un excellent état général et la mort ne survient spontanément que pour quelques-uns d'entre eux. Sept hamsters meurent spontanément dans des délais variant entre huit et trente et un mois après l'inoculation du champignon ; deux cobayes meurent après trois et trente-sept mois. Encore faut-il souligner que parmi ces animaux, certains ont succombé à une affection bactérienne ou même, semble-t-il, sont morts de vieillesse ! Jamais, d'autre part, on n'observe lors des autopsies, d'atteintes spectaculaires des organes principaux comme cela se voit fréquemment avec les souches humaines d'*Histoplasma capsulatum*.

De façon générale, on ne retrouve l'*Histoplasma* que dans l'organe inoculé ou dans les organes qui se trouvent aux environs immédiats du point d'inoculation.

Dans certains cas, chez le hamster en particulier, on assiste à une lente généralisation de l'histoplasmose avec invasion du foie, de la rate et des poumons. La maladie fongique peut alors être vraiment la seule cause de la mort de l'animal.

Chez deux animaux (un cobaye et un hamster) le champignon partant du point d'inoculation s'est fixé dans des lésions cutanées ou sous-cutanées sans aucune lésion viscérale apparente. Chez deux hamsters, l'histoplasme s'est localisé dans les viscères sans y déterminer de lésions majeures, mais il a, au niveau des pattes, provoqué la formation de gommages fongiques où les levures pullulent.

Fréquemment, au moins chez les animaux récemment inoculés, les cultures d'organes sont positives alors qu'un examen attentif des coupes des mêmes organes ne permet pas d'y mettre le champignon en évidence. Dans le cas des inoculations intrapéritonéales, on peut penser que des spores inoculées sont présentes dans le liquide péritonéal et sont à l'origine des rétrocultures positives, sans toutefois pénétrer à l'intérieur des tissus. Pourtant, dans une des coupes des souris sacrifiées deux jours après l'inoculation par voie intraveineuse, des filaments du champignon sont observés en bordure du foie, extérieurement au tissu. Dans le cas des inoculations intratesticulaires, les spores et fragments mycéliens inoculés peuvent être plus ou moins phagocytés et, de ce fait, leur mise en évidence est rendue malaisée, voire impossible; nous avons pu, cependant, voir des chlamydospores échinulées provenant de l'inoculum, chez des cobayes sacrifiés quinze et vingt et un jours après l'inoculation (pl., fig. 1).

Les rétrocultures d'organes effectuées à partir d'animaux sacrifiés dans les premiers temps de l'expérience (deux, cinq, huit et quinze jours) sont positives, alors que les rétrocultures effectuées à partir d'animaux sacrifiés entre trente et quatre-vingt-dix jours sont négatives. On assiste donc à une disparition apparente de toutes les cellules fongiques inoculées. Cependant, il semble que quelques rares spores subsistent dans l'organisme de l'animal, sans s'y développer, mais en gardant toutefois leur entière viabilité. A l'occasion d'une modification du terrain, les spores présentes germent et se développent. Cette phase de croissance peut se produire de nombreux mois après l'inoculation. Après des mois d'inactivité apparente, le champignon commence sa très lente invasion de l'organisme dans lequel il avait été injecté.

Dans aucun des cas que nous avons étudiés, il ne nous a été possible de mettre en évidence de petites levures telles que celles que l'on observe dans l'histoplasmose américaine. On sait pourtant que lorsque l'on inocule à l'animal, par exemple dans le testicule du cobaye, une souche d'*Histoplasma capsulatum*, var. *duboisii* à grandes formes, on constate toujours dans le tout début de l'infection la présence de formes levures de petites dimensions (2-4 μ). Avec le temps, ces levures atteignent les dimensions plus grandes qui sont celles de l'Histoplasme à grandes formes [6]. Dans les diverses expériences où nous avons sacrifié des animaux à intervalles de temps déterminés (deux, cinq... quatre-vingt-dix jours) après l'inoculation, il ne nous a pas été possible, malgré de nombreux examens, de rencontrer de petites formes du champignon. Ceci ne suffit malheureusement pas pour affirmer que la phase « petites formes » n'existe pas chez la souche « singe », tout au plus peut-on le supposer.

Du point de vue histologique, les lésions provoquées tant chez

les singes spontanément infectés que chez les animaux expérimentalement inoculés sont de type giganto-cellulaire, comme en général pour toutes les histoplasmoses à grandes formes. Ce type de lésions s'oppose à la réaction histiocytaire qui caractérise l'histoplasmose à petites formes.

Dans l'histoplasmose spontanée comme expérimentale, de type américain comme du type africain, la taille des parasites présents dans les lésions paraît en effet conditionner l'aspect de la réaction cellulaire [4]. Les levures de la souche « singe » d'*Histoplasma capsulatum* ont des dimensions qui peuvent varier d'environ 4 ou 5 μ à 13 μ et plus, les dimensions les plus fréquentes étant en moyenne 7 $\times$ 8 μ aussi bien chez les singes que chez les hamsters et cobayes.

La souche d'*Histoplasma* isolée du singe se singularise donc de nouveau en présentant des propriétés biologiques distinctes de celles communément rapportées pour les diverses souches d'*H. capsulatum* étudiées [7, 8] et, de ce point de vue également, se rapproche de l'espèce *H. farciminosum*. Cela semble pouvoir être interprété comme une nouvelle étape vers une reconnaissance définitive de cette souche nettement particularisée, comme variété nouvelle de l'espèce *H. capsulatum*.

RÉSUMÉ.

On étudie le pouvoir pathogène expérimental de la souche d'*Histoplasma capsulatum* isolée de l'histoplasmose spontanée du singe africain dont 7 cas ont été rapportés. Le cobaye, le hamster et la souris blanche sont utilisés dans diverses séries d'expériences où la phase filamenteuse du champignon est introduite par diverses voies dans l'organisme animal. Il ressort des différents essais que :

a) La souche « singe » d'*H. capsulatum* a un pouvoir pathogène bien plus réduit que les diverses autres souches des variétés d'*H. capsulatum* à petites et à grandes formes. Peu d'animaux succombent spontanément à l'inoculation et, dans ce cas, la mort ne survient jamais que plusieurs mois après l'inoculation.

b) Parmi les nombreuses spores inoculées, certaines peuvent subsister dans l'organisme animal pendant longtemps et être à l'origine d'une généralisation tardive souvent inapparente de la maladie.

c) Dans les divers essais, il n'a jamais été possible de mettre en évidence la petite forme du champignon telle qu'on l'observe dans les premiers temps d'une infection expérimentale par les variétés africaine ou américaine d'*Histoplasma capsulatum*. Les dimensions des levures dans les tissus varient cependant grandement. Certaines plages de cellules renferment des levures mesu-

rant par exemple en moyenne $5,1 \times 3,8 \mu$, alors que des plages voisines montrent des levures atteignant un diamètre moyen de $11,3 \mu$. Les dimensions les plus communes des levures varient aux environs de 7 à 8μ .

d) La souche « singe » d'*H. capsulatum* se singularise donc également par ses propriétés biologiques.

SUMMARY

EXPERIMENTAL PATHOGENICITY OF A STRAIN
of *Histoplasma capsulatum* ISOLATED FROM AFRICAN MONKEYS.

Description of seven cases of spontaneous histoplasmosis in *Cynocephalus babuin* and experimental study of the pathogenicity of the strain isolated. Guinea pigs, hamsters, albino mice have been inoculated by various routes with the filamentous phase of the parasite. The results were as follows :

a) The « monkey » strain of *H. capsulatum* is markedly less pathogenic than other strains of large or small cell *H. capsulatum*. Few animals spontaneously die after inoculation, and in each case, only several months after infection.

b) Among the numerous spores inoculated, a few may persist a very long time in the animal organism and may induce a delayed, often inapparent, disease.

c) In none of the experiments it has been possible to demonstrate the small form of the fungus, such as formed in the initial stage of an infection following inoculation with the African or American varieties of *H. capsulatum*. The size of the yeast in the tissues varies however in a wide range. Certain cellular areas contain yeast cells with a mean size of $5,1$ to $3,8 \mu$; others contain cells the mean diameter of which is $11,3 \mu$.

d) Consequently, the « monkey » strain is also recognizable by its peculiar biological properties.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] COURTOIS (G.), SEGRETAIN (G.), MARIAT (F.) et LEVADITI (J.-C.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 124.
- [2] MARIAT (F.) et SEGRETAIN (G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 874.
- [3] DUBOIS (A.), JANSSENS (P. G.), BRUTSAERT (P.) et VANBREUSEGHEM (R.). *Ann. Soc. Belge Méd. trop.*, 1952, **32**, 559.
- [4] LEVADITI (J. C.), DROUHET (E.), SEGRETAIN (G.) et MARIAT (F.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959.
- [5] MARIAT (F.) et DROUHET (E.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **86**, 485.
- [6] DUBOIS (A.) et VANBREUSEGHEM (R.). *Ant. v. Leeuw.*, 1956, **22**, 105.
- [7] DROUHET (E.) et SCHWARZ (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 144.
- [8] WANG (C. J. K.), SCHWARZ (J.) et BAUM (G. L.). *Mycopathol. Mycol. applic.*, 1958, **10**, 53.

**CONTRIBUTION A L'ÉTUDE
DE *BACILLUS CEREUS* FRANK ET FRANK
CRISTALLOPHORES ET PATHOGÈNES
POUR LES LARVES DE LÉPIDOPTÈRES**

par C. TOUMANOFF et Y. LE CORROLLER (*).

(Institut Pasteur)

Parmi les représentants du genre *Bacillus*, ceux appartenant à l'espèce *B. cereus* Frank et Frank ont été fréquemment reconnus pathogènes pour les larves de Lépidoptères, chez lesquelles on rencontre également diverses autres bactéries aérobies sporogènes.

Les connaissances acquises sur le genre *Bacillus* Kohn ont permis de caractériser *Bacillus cereus* Frank et Frank mieux que certaines autres espèces.

Avant que ces caractères aient été précisés, *B. cereus* a été parfois confondu avec *B. megaterium*.

Ces deux espèces sont caractérisées par le fait que le diamètre de leurs cellules jeunes est toujours de 0,9 μ ou plus.

Au point de vue biochimique, *B. megaterium* se distingue par l'acidification du mannitol avec des sels d'ammonium comme source d'azote (Bergey et coll.), l'absence de formation d'acétylméthylcarbinol, la non-production de lécithinase, donc pas de blanchiment de la gélose au jaune d'œuf et pas de blanchiment ni durcissement du jaune d'œuf en eau physiologique.

Bacillus cereus est caractérisé, par contre, par une production le plus souvent intense mais parfois faible de lécithinase. En outre, il n'acidifie pas le mannitol avec des sels d'ammonium comme source d'azote (Bergey et coll.) et forme de l'acétylméthylcarbinol.

Parmi les souches entomophages de *B. cereus*, l'une a été désignée par Smith, Gordon et Clark sous le nom de *B. cereus* var. *thuringiensis* [14].

(*) Manuscrit reçu le 3 février 1959.

D'après la description de Berliner, la formation des spores par *B. thuringiensis* s'accompagnait, au moment de la lyse bactérienne, de libération de corpuscules qu'il désigna sous le nom de « Restkörperchen ».

Ces formations ont été bien décrites en 1955 par Hannay, qui établit qu'il s'agissait d'inclusions cristallines protéiques dont la nature exacte fut précisée par Hannay et Fitz-James (1955).

Il fut démontré ensuite (Angus, 1955 ; Toumanoff, 1956 ; Fitz-James, Toumanoff et Young, 1958) que ces inclusions étaient toxiques pour les larves de Lépidoptères.

Depuis, un intérêt particulier a été porté aux *cereus* porteurs de cristaux, et plusieurs souches de ce bacille portant des inclusions cristallines ont été isolées.

Nous avons proposé de dénommer les souches de *cereus* porteurs de cristaux sous le nom de cristallophores.

Dans plusieurs publications antérieures nous avons précisé les caractères des divers *cereus* entomophytes cristallophores.

Il est apparu que différentes souches de *B. cereus* pathogènes pour les larves de Lépidoptères montrent une individualité indiscutable.

Parmi les bacilles pathogènes pour les larves de Lépidoptères, *Bacillus dendrolimi* Talalaïev a été isolé de *Dendrolimus sibiricus*, parasite des conifères en Sibérie ; un bacille a été isolé par Weiser, en Tchécoslovaquie, de *Plodia interpunctella* ; et *Bacillus cereus* var. *galleriae* a été isolé, par Schwetzowa, des chenilles de la fausse teigne des ruches.

Grâce à l'obligeance du Dr Lyssenko, du Laboratoire de Bactériologie de l'Institut Biologique de Tchécoslovaquie (Prague), nous avons pu obtenir ces souches, et nous avons cru utile de les étudier afin de les comparer avec celles, déjà connues, et décrites sous les noms de *B. cereus* var. *thuringiensis* (souche Mattes d'Allemagne, reçue de Steinhaus et provenant d'*Ephestia kühniella*), *B. cereus* var. *sotto* (Ishiwata) et *B. cereus* var. *alesti* Toum. et Vago isolé du ver à soie.

Du point de vue morphologique, les trois souches ne présentent pas de différence notable, l'aspect de la plupart des bactéries étant identique.

En ce qui concerne *B. dendrolimi*, ce bacille se présente sous forme de bâtonnets dont la taille varie de 1 à 4 μ .

Les caractères biochimiques de ce bacille et des trois autres germes présentés sur le tableau ci-joint correspondent à ceux de *Bacillus cereus* (Cf. tableau).

Présentant des inclusions cristallines et produisant une lécithinase, ces germes attestent ainsi des affinités avec d'autres *cereus* cristallophores qui parasitent les insectes.

<u>Bacillus cereus</u> var	: <u>Dendrolimi</u> : (Talalaieff)	: <u>Galleriae</u> : (Souche d'U.R.S.S.)	: <u>Thuringiensis</u> : (envoi de Weiser)
Bouillon ordinaire	: Cult. ++ : léger trouble : léger dépôt	: Cult. ++ : trouble important : pas de dépôt	: Cult. ++ : trouble important : pas de dépôt
Gélose ordinaire	: Cult. ++, en film, : brillante, trans- : lucide.	: Cult. ++, en film, : mate, blanchâtre :	: Cult. ++, en : film, mate :
Gélose mobilité	: mobilité +	: mobilité +	: mobilité +
Gélose profonde	: aérobie-anaérobie, : gaz +	: aérobie-anaérobie : gaz +	: aérobie- anaéro- : bie, gaz +
Gélose à l'oeuf	: Cult. ++ : blanchiment ++	: Cult. ++, tardif et : blanchiment incomplet:	: Cul. ++ : blanchiment ++
Gélose glucosée au rouge neutre	: léger virage du : milieu. Gaz +	: Pas de modification :	: dépôt blanchâtre : en surface. Gaz +
Gélose au sang	: Noircissement du : milieu, pas d'hémo- : lyse.	: Noircissement du milieu : Pas d'hémolyse.	: Pas d'hémolyse
Gélose au plomb	: pas d'H ₂ S	: pas d'H ₂ S	: pas d'H ₂ S
Sérum coagulé et milieu de Loeffler	: Cult. ++, blanche, : grasse. Digestion : +++ (lente)	: Cult. ++, blanche, : mate. Digestion + : (lente)	: Cult. ++, blan- : che. Digestion + : (lente)
Pomme de terre	: Cult. ++, blanche, : grisâtre, mate. Pas : de bruissement	: Cult. ++ (en chou fleur) : brunissement +++ (lent) :	: Cult. +, : brunissement + : (lent)
Lait tournesolé	: léger virage : digestion - (lente)	: Pas de virage. Diges- : tion - (lente)	: léger virage : Digestion - (lente)
Petit lait tourne- solé	: léger virage rose, : rapide	: virage complet mauve : (4 jours)	: virage complet : mauve (4 jours)
Sucres fermentés en: 24 h à 48 h (en eau peptonée)	: glucose, levulose, : maltose, saccharo- : se.	: glucose, levulose, mal- : tose, saccharose, dex- : trine.	: glucose, levulose : maltose, saccha- : rose.
Urée	: uréase 0	: uréase 0	: uréase 0
Indole	: indole 0	: indole 0	: indole 0
A.M.C. Rouge méthyle	: A.M.C. 0 : R.M. 0	: A.M.C. 0 : R.M. 0	: A.M.C. 0 : R.M. 0
Catalase	: +	: +	: +

Lorsqu'on examine de près tous les caractères de *Bacillus dendrolimi*, on note son action protéolytique très nette, bien plus forte que celle des autres bacilles.

En effet, le milieu au sérum coagulé et le milieu de Loeffler sont rapidement et fortement liquifiés par ce bacille. A ce point de vue, le bacille de *Dendrolimus sibiricus* s'apparente à la souche cristallophore de *B. sotto*, dont les caractères ont été précisés antérieurement [47].

Cette souche forme d'autre part de l'indole, contrairement à la plupart des autres *cereus* cristallophores.

Elle produit de la lécithinase, mais le blanchiment du milieu

gélose-sérum au jaune d'œuf se fait assez lentement et totalement.

La croissance sur pomme de terre de cette souche diffère également de celle d'autres bacilles entomophages ; elle ne s'accompagne pas de brunissement de la surface du milieu, lequel se produit lentement et faiblement pour la souche *thuringiensis* de Weiser et lentement mais fortement pour *Bacillus cereus* var. *galleriae* d'U. R. S. S.

Cette dernière souche, provenant de *Galleria melonella*, se compose également de bâtonnets de taille variable allant de 0,8 à 5,5 μ dont les spores mesurent de 1,2 à 2 μ , et eux aussi pourvus d'inclusions cristallines.

Elle se distingue du bacille de *Dendrolimus sibiricus* et aussi de celui de *Plodia interpunctella* (souche *thuringiensis* de Weiser) par son action assez limitée sur le jaune d'œuf.

En effet, après ensemencement en surface sur gélose-sérum au jaune d'œuf, le blanchiment du milieu ne commence qu'au bout de quarante-huit à soixante-douze heures, n'intéresse en profondeur que 1 à 2 mm du milieu au quatrième jour et n'est pas encore total au quinzième jour.

La production de lécithinase par cette souche paraît donc bien plus faible que celle des autres souches, fait inhabituel pour les *cereus* s'attaquant aux insectes.

On doit noter, également, que la souche *galleriae* fermente non seulement le glucose, le lévulose, le maltose et le saccharose, mais aussi la dextrine, ce qui est exceptionnel pour les *cereus*.

Nous avons constaté que la souche de *B. cereus* de Weiser se rapproche beaucoup de *Bacillus cereus* var. *thuringiensis* de Mattes et peut être cataloguée selon les apparences comme *B. cereus* var. *thuringiensis*.

Cela n'est du reste pas étonnant, car *Plodia interpunctella* et *Ephestia kühniella* ont des habitats semblables et peuvent voisiner dans les greniers contenant des produits alimentaires.

On sait, en effet, que *P. interpunctella* se rencontre dans la farine, principalement dans celle du maïs, dans les graines, les fruits desséchés, le chocolat, les arachides, dans différentes noix, etc.

Ephestia kühniella est, plus spécialement, adaptée à la farine du blé, mais est trouvée également dans les fruits desséchés et les grains. Il n'est donc pas étonnant que le même germe parasite deux hôtes proches l'un de l'autre grâce à leurs contacts possibles dans un même milieu.

Lorsqu'on désire reconnaître l'affinité de divers germes, on doit toujours tenir compte de l'hôte qu'ils parasitent et de son biotope.

La biologie de l'hôte, son régime alimentaire et son milieu

environnant sont les facteurs qui régissent certainement l'effet pathogène et aussi les caractères biochimiques et morphologiques du germe pathogène.

Dans l'ensemble, on doit conclure que trois nouveaux bacilles, récemment mentionnés comme étant pathogènes pour les larves de Lépidoptères, peuvent être considérés comme souches cristallophores de *Bacillus cereus*.

Les recherches de Filtz-James [8] ont démontré que, cultivées en milieu synthétique, diverses souches de *Bacillus cereus* présentent une forme et une dimension caractéristiques en ce qui concerne leurs inclusions cristallines, et il a été ainsi établi que la dimension des spores correspond dans l'ensemble à celle des inclusions cristallines.

Nous n'avons pas utilisé de milieu synthétique et nous avons constaté que, cultivées sur gélose ordinaire, toutes les souches mentionnées dans ce travail montrent des inclusions cristallines de taille variable, ce qui dénote que les bacilles âgés en voie de sporulation et de formation de cristaux peuvent être de taille variable [pl. I] (1).

En étudiant nos souches, nous avons constaté que *Bacillus cereus* var. *thuringiensis* isolé par Weiser de *Plodia interpunctella* et celui de Schwetzowa provenant de *Galleria melonella* formaient, sur gélose ordinaire, non seulement des inclusions cristallines normales, mais d'autres plus petites et plus ou moins irrégulières, rhomboédriques, cubiques, et même de petits amas informes constitués aussi, probablement, de protéines (pl. II, fig. 1).

Par contre, ces formations n'ont pas été observées dans les cultures de *Bacillus cereus* var. *dendrolimi*.

Nous avons obtenu d'autre part de M. le Dr Krieg, du Laboratoire de la lutte biologique contre les insectes nuisibles de Darmstadt, deux souches cristallophores isolées l'une de *Galleria melonella* et l'autre d'*Euxoa (segetum ?)*

Ces souches n'ont été encore que sommairement étudiées.

Il a été établi, toutefois, qu'il s'agit dans les deux cas de *Bacillus cereus*.

La première comme la seconde de ces souches blanchissent la gélose au jaune d'œuf, mais ni l'une ni l'autre ne produisent, sur gélose-sérum au jaune d'œuf, ou en suspension de jaune d'œuf, le pigment caractérisant *Bacillus cereus* var. *alesti*.

La souche d'*Euxoa* est caractérisée par un effet fortement marqué sur le milieu au sérum coagulé, le liquéfiant lentement

(1) Les photomicrographies accompagnant ce travail ont été effectuées pour nous par M. Giuntini, à qui nous exprimons notre reconnaissance.

mais complètement, et se rapproche ainsi de *Bacillus cereus* var. *sotto* et de *B. cereus* var. *dendrolimi*. De plus elle produit comme *alesti* un pigment rouge, mais seulement sur jaune d'œuf pur coagulé à 80° et non sur gélose sérum au jaune d'œuf (2).

En ce qui concerne la souche de *Galleria* d'Allemagne, elle se rapprocherait le plus, et c'est un fait curieux, de *Bacillus cereus* var. *thuringiensis*.

Elle est en effet tout à fait différente de *Bacillus cereus* var. *galleriae* provenant d'U. R. S. S.

On doit remarquer, cependant, qu'*Ephestia kühniella* peut se rencontrer parfois dans des débris de cire mal protégée et y introduire des germes.

Quoi qu'il en soit, la présence d'inclusions cristallines dans des bacilles présentant tous les caractères de *B. cereus*, mais attestant certaines particularités selon l'hôte qu'ils parasitent comme nous l'avons déjà indiqué [19], n'autorise pas à considérer ces souches entomophages comme appartenant à une espèce spéciale.

On ne saurait ainsi retenir la dénomination de *B. thuringiensis* pour ces souches de *cereus*, comme cela a été fait récemment [12].

On pourrait, selon nous, diviser actuellement les *B. cereus* qu'on rencontre chez les insectes en deux grands groupes :

I. Souches acristallines peu ou pas pathogènes pour les larves de Lépidoptères (*B. cereus* Frank et Frank type).

II. Souches cristallophores, portant des inclusions cristallines toxiques pour les larves de Lépidoptères (*B. cereus* Frank et Frank ; *entomophages*).

Les connaissances concernant diverses souches, rapportées dans cette note et antérieurement, permettent de dissocier parmi les *cereus* entomophages et cristallophores des variétés suffisamment individualisées dont voici les caractéristiques (pl. II, fig. 2).

A. Souches blanchissant fortement la gélose-sérum au jaune d'œuf et durcissant plus ou moins rapidement et totalement la suspension de jaune d'œuf, n'exerçant qu'un faible effet ou un effet nul sur le milieu au sérum coagulé et le milieu de Loeffler dans l'eau physiologique :

1° *Bacillus* parasitant surtout les insectes s'attaquant aux produits alimentaires [farine, graines, etc.] (*B. cereus* var. *thuringiensis*).

2° *Bacillus* n'exerçant qu'un effet faible sur la gélose-sérum-jaune d'œuf. Blanchiment incomplet au bout de quelques jours [1/3 à 1/2

(2) La propriété qu'a cette forme de produire du pigment, comme *alesti*, nous a été signalée par le D^r Krieg, qui nous a très aimablement communiqué cette souche pour notre étude.

de l'épaisseur de la gélose inclinée ensemencée en surface] (*B. cereus* var. *galleriae* [U. R. S. S.]).

3° Fort effet sur le milieu au sérum coagulé ; *Bacillus* parasitant les chenilles phytophages :

a) Digestion lente mais totale du milieu de Loeffler et du sérum coagulé (*B. cereus* var. *sotto*) ;

b) Digestion rapide et totale du milieu de Loeffler et du sérum coagulé (*B. cereus* var. *dendrolimi*) ;

B. Souches productrices de pigment.

1° Production d'un pigment rouge violacé, d'intensité variée, sur gélose-sérum au jaune d'œuf et à la surface de la suspension de jaune d'œuf dans l'eau physiologique. Digestion partielle du sérum coagulé et du milieu de Loeffler (*B. cereus* var. *alesti*).

2° Production de pigment rouge sur jaune d'œuf pur coagulé. Digestion très lente mais totale du milieu de Loeffler et du sérum coagulé (*B. cereus* var. *euxoae*).

Cette clé de détermination des *Bacillus cereus* entomophages et cristallophores qui est appelée certainement à subir des modifications ultérieures sera, selon nous, utile à tous ceux qui s'occupent de la pathologie des insectes.

Il est souhaitable que la taxonomie des *cereus* pathogènes soit étudiée non seulement en se basant sur la morphologie des germes et sur leurs caractères biochimiques dont on ne saurait nier l'importance, mais aussi sur les hôtes parasités et le biotope de ces hôtes.

On ne peut, en effet, exclure que le régime alimentaire de l'hôte entre en ligne de compte du point de vue de l'action pathogène des divers germes. C'est ainsi que *Bacillus cereus* var. *alesti*, qui s'avère particulièrement pathogène pour les vers à soie, et également, mais moins, pour d'autres larves de Lépidoptères phytophages, n'a pas d'action bien nette sur *Ephestia* et a un effet bien faible sur *Galleria melonella*.

En ce qui concerne *Bacillus sotto* et *B. thuringiensis* (souche de Mattes), ils se sont montrés, dans nos expériences, sans effet appréciable sur les chenilles de la fausse teigne. Par contre, le bacille isolé de *Galleria* par Krieg et qu'on peut, d'après nous, rattacher à *B. thuringiensis*, est fortement pathogène pour cet insecte.

S'il est indéniable que, par une série de passages *per os* ou par injection, une souche banale de *cereus* peut devenir virulente, il est certain aussi qu'il existe une spécificité d'action caractérisant les germes qu'on isole de tel ou tel insecte, spécificité dont il y aurait intérêt à élucider les raisons dans chaque cas particulier.

SUMMARY

CONTRIBUTION TO THE STUDY OF CRYSTALLOPHOROUS STRAINS
OF *Bacillus cereus* FRANK AND FRANK,
PATHOGENIC FOR LEPIDOPTERA LARVAE.

Some new strains of aerobic spore-bearing insect pathogens are described.

They have been isolated by different authors in Czechoslovakia, U. R. S. S. and West Germany. We are indebted to them for having kindly transmitted their strains, which have been identified as belonging to the genus and species *Bacillus cereus*, each of them showing particular characters.

Indeed all these spore-bearing aerobic bacteria belonging to the genus *Bacillus* are to be considered as *B. cereus*, even if showing certain differences between them.

Recently it has been suggested that all *Bacillus* organisms containing crystalline inclusions should be considered as forming a separate species called *B. thuringiensis*. This suggestion should be rejected.

They all possess the general characteristics of *B. cereus* and for this reason should be labeled «crystallophorous entomophagous varieties», as recently suggested by one of the authors (T.).

In the course of our investigations, it has been stated that in certain ordinary media, the size of spores and crystalline inclusions varies according to the different varieties studied.

One of the strain studied, called *B. cereus* var. *euxoae*, produces a red pigment, like *B. cereus* var. *alesti*, but only on pure sterile coagulated egg-yolk, and not on other yolk containing media used for the cultivation of *B. cereus* var. *alesti*. This strain can be differentiated from *B. cereus* var. *alesti* by its high proteolytic activity.

It is suggested that the different aerobic spore-bearing pathogens should be studied in connection with the physiology of the host, varying from an insect to another according to the nutrition.

A key is suggested for determination of the different crystallophorous strains studied.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ANGUS (T. A.). *Nature*, 1954, **173**, 545.
- [2] ANGUS (T. A.). *Can. J. Microbiol.*, 1956, **2**, 111.
- [3] ANGUS (T. A.). *Can. J. Microbiol.*, 1956, **2**, 122.
- [4] ANGUS (T. A.). *Can. J. Microbiol.*, 1956, **2**, 416.

- [5] *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7^e édit. The William et Wilkins Co. Baltimore, 1957, 619.
- [6] BERLINER (E.). *Z. ges. Getreidew.*, 1911, **3**, 63.
- [7] FITZ-JAMES (P. C.). *Can. J. Microbiol.*, 1955, **1**, 502.
- [8] FITZ-JAMES (P. C.). In *Spores*. Edité par H. O. Halvorson. Allerton spore conference, University of Illinois. *Am. Inst. Biol. Sci.*, Washington, D. C., 1957,, Publ. n° 5, 85.
- [9] FITZ-JAMES (P. C.), TOUMANOFF (C.) et YOUNG (E.). *Canad. J. Microbiol.*, 1958, **4**, 385.
- [10] HANNAY (C. L.) et FITZ-JAMES (P. C.). *Can. J. Microbiol.*, 1955, **1**, 694.
- [11] HANNAY (C. L.). *Nature*, 1953, **172**, 1004.
- [12] HEIMPEL (A. M.) et ANGUS (T. A.). *Can. J. Microbiol.*, 1958, **4**, 531.
- [13] LE CORROLLER (Y.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **94**, 670.
- [14] SMITH (N. R.), GORDON (R. E.) et CLARK (F. E.). *Aerobic spore forming bacteria*. U. S. Dept. Agr. Monograph. n° 16, 1952.
- [15] STEINHAUS (E. A.). *Hilgardia*, 1954, **23**, 1.
- [16] TOUMANOFF (C.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **87**, 486.
- [17] TOUMANOFF (C.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 384.
- [18] TOUMANOFF (C.) et VAGO (C.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 388.
- [19] TOUMANOFF (C.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 644.
- [20] TOUMANOFF (C.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 660.

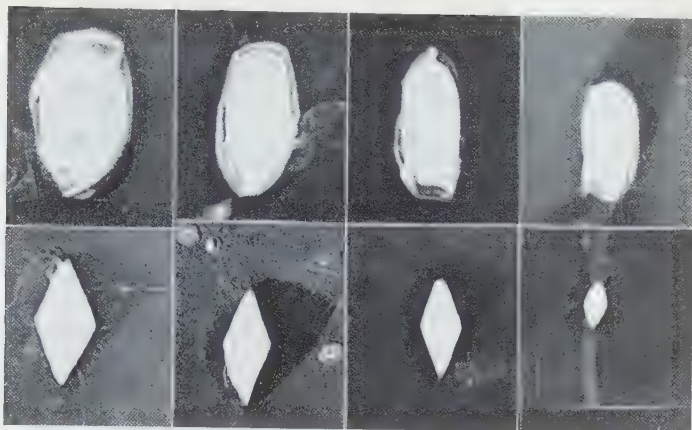
LÉGENDE DE LA PLANCHE I

T. — Photomicrographies électroniques montrant les spores et les inclusions cristallines de *Bacillus cereus* var. *dendrolimi*. On voit la différence de taille qu'on observe en culture sur gélose ordinaire.

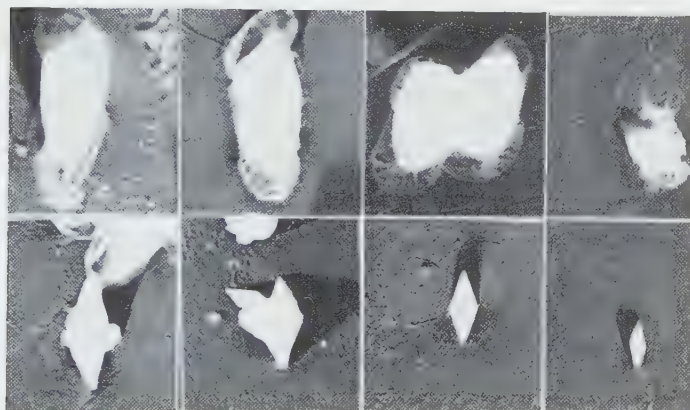
W. — Même photomicrographie pour *Bacillus thuringiensis* (souche Weiser) isolé de *Plodia interpunctella* montrant également la différence de taille des spores et des inclusions cristallines.

G. — *Bacillus cereus* var. *galleriae* de Schwetzova. On voit également la différence de taille des spores et des inclusions cristallines. Gr. $\times$ 13 900.

T



W



G

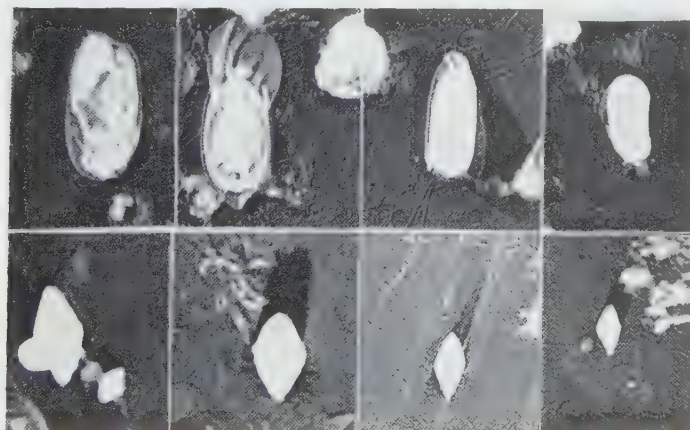


PLANCHE I.
MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS.

LÉGENDE DE LA PLANCHE II.

FIG. 1. — Les cristaux d'aspect irrégulier : W, *Bacillus cereus* var. *thuringiensis* souche Weiser (isolée de *Plodia interpunctella*) et G, *Bacillus cereus* var. *galleriae* de Schwetzova. Gr. $\times 13\ 900$.

FIG. 2. — Effet des différentes variétés de *Bacillus cereus* entomophages et cristallophores sur le sérum coagulé (milieu de Loeffler), culture de 96 heures. De gauche à droite : *B. cereus* var. *thuringiensis*, *B. cereus* var. *alesti*, *B. cereus* var. *solto* et *B. cereus* var. *dendrolimi*. L'action protéolytique est différente pour les diverses variétés de *cereus*.

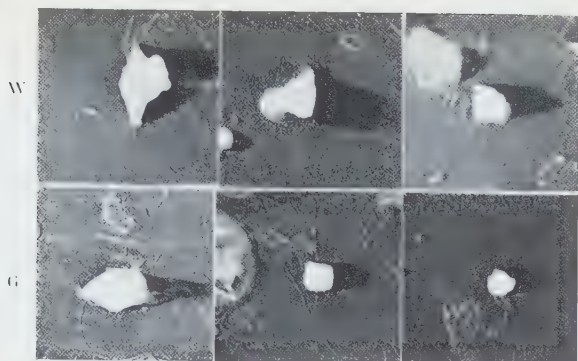


FIG. 1



FIG. 2.

PLANCHE II.

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS.



**ÉTUDE DE TROIS SOUCHES MICROBIENNES
FAMILLE DES PSEUDOMONADACEAE
DONT LA SYNERGIE PROVOQUE
UNE MALADIE DE CARACTÈRE SEPTICÉMIQUE
CHEZ LES POISSONS BLANCS DE LA DORDOGNE,
DU LOT ET DE LEURS AFFLUENTS**

par J. BRISOU (*), C. TYSSET et B. VACHER (**).

(Ecole de Médecine de Poitiers et Laboratoire de Biologie
de la Section Technique de l'Armée [Paris])

En juillet 1957, P. Vivier faisait connaître, au Congrès de l'Association Française pour l'avancement des Sciences de Périgueux [1], le caractère envahissant d'une parasitose due à un Copépode du genre *Tracheliastes* (*Tr. polycolpus* N.).

Ce Copépode provoquerait sur les poissons blancs une morbidité considérable et consécutivement une mortalité élevée.

Ce sont surtout les vandoises (*Leuciscus leuciscus* var. *rostratus*), les hotus (*Chondrostoma toxostoma*) et, à un degré moindre, les goujons (*Gobio fluviatilis*), les ablettes (*Alburnus lucidus*), les gardons (*Leuciscus erythrophthalmus*) qui payent le plus fort tribut à cette affection.

La maladie est saisonnière. Elle sévit surtout pendant les mois chauds (mai-septembre). Le plus souvent, ce sont les poissons vivant dans les parties relativement basses des cours d'eau qui sont parasités. En amont de certaines limites, où l'eau est fraîche et oxygénée, la morbidité disparaît. Ceci n'est pas fait pour nous surprendre. L'action thermique du substrat est un paramètre qu'il ne faut pas sous-estimer. Nous avons montré que la virulence de *Fl. hydrophilum* [2] suivait une courbe parallèle à l'augmentation calorique du milieu ambiant.

Vivier pense que le Copépode à lui seul ne peut être la cause de la mortalité élevée sévissant depuis deux ans chez les poissons

(*) 15, rue Alsace-Lorraine, Poitiers (Vienne).

(**) Société Française de Microbiologie, séance du 5 février 1959.

des rivières du Périgord, du Limousin et du Quercy. L'un de nous a été surpris de constater que, sur des poissons agonisants, le nombre de parasites était relativement réduit et les lésions cutanées consécutives insignifiantes. Nous pensions alors, avec Vivier, que ce parasitisme, en diminuant la résistance des individus, crée un terrain propice au développement des microbes aquatiques, ceux-ci pénétrant alors dans l'organisme amoindri à la faveur des micro-plaies cutanées parasitaires. Par passages successifs *in vivo* sur des organismes déficients, ces germes deviennent spécifiquement virulents et déclenchent alors une septicémie à mortalité élevée.

Pour étayer notre hypothèse, nous avons pratiqué une trentaine de nécropsies chez des vandoises présentant des caractères morbides accusés. A l'autopsie, nous avons relevé invariablement les lésions suivantes : micro-hémorragies sous-cutanées dans la région ventrale, pétéchies intramusculaires, congestion et dégénérescence du foie, cholécystite, hypertrophie de la rate.

Le sang du cœur, prélevé aseptiquement, fut ensemencé sur bouillon nutritif ordinaire. L'isolement classique pratiqué en boîte de Petri a mis en évidence cinq types de colonies. Les germes suivants furent identifiés :

- a) *Empedobacter balustinum* [4].
 - b) *Flavobacterium vadosum* (1).
 - c) *Flavobacterium lacunogenes* (1).
 - d) Diplocoque
 - e) Staphylocoque
- } non identifiés.

ETUDE D'UNE SOUCHE D'EMPEDOBACTER : *EMPEDOBACTER BALUSTINUM*.

I. — MORPHOLOGIE.

1° *Examen à l'état frais*. — Bâtonnets à extrémités arrondies, de $1,4\ \mu$ à $1,6\ \mu$ de long sur $0,8\ \mu$ de large. Ils revêtent parfois des aspects coccobacillaires de $0,8\ \mu$ de diamètre. Ils sont immobiles.

2° *Examen après coloration*. — Sur frottis fixés, ces bacilles prennent facilement les couleurs d'aniline. Ils ne gardent pas la coloration de Gram. Leurs extrémités arrondies sont bien colorées ; leur centre est clair (coloration bipolaire très nette).

En culture de vingt-quatre heures, sur gélose inclinée, on rencontre des formes bacillaires, coccoïdes et parfois en courtes chaînettes. Sur bouillon nutritif ordinaire, ce sont les formes en

(1) Feront l'objet de notes séparées.

chaînettes qui prédominent, constituées de 4 à 6 éléments ; elles ont de $3,8\ \mu$ à $5,5\ \mu$ de longueur.

Sur les vieilles cultures, ce germe présente un pléomorphisme accentué. Il n'a ni spores, ni capsules, ni ciliature.

II. — CARACTÈRES DES CULTURES.

1° Conditions des cultures.

Conditions physiques. Ce sont des microbes aérobies préférentiels. Ils poussent entre $+4^{\circ}\text{C}$ et $+35^{\circ}\text{C}$ (optimum de croissance 25°C et 28°C). Ils ne poussent pas à 37°C . Leur développement est abondant dans un milieu ajusté à pH 7,2. Les pH d'arrêt sont 3 et 11.

Conditions chimiques. En milieu de Stephenson, avec du nitrate d'ammonium comme source d'azote, ils utilisent le carbone du propanol. Ils donnent des cultures maigres avec le méthanol, le benzène, les pétroles lampants, l'oxalate d'ammonium. Ils n'utilisent pas de carbone de l'éthanol, du butanol ainsi que du glycol éthylénique.

2° Aspects des cultures dans les milieux usuels.

Sur bouillon nutritif, la culture est lente. En vingt-quatre heures le milieu est trouble. Il n'y a pas de formation de voile ou d'anneau. Le dépôt des corps microbiens au fond du tube est peu important.

Sur eau peptonée ordinaire, la culture est rapide à $+28^{\circ}\text{C}$; vers la huitième heure il y a apparition d'ondes moirées. On n'observe pas de formation de voile. Les corps microbiens sédimentent au fond du tube pour donner un dépôt jaunâtre augmentant avec le temps.

Milieux aux nitrates. C'est le milieu de prédilection.. En quatre à cinq heures la culture est perceptible. En vingt-quatre heures le milieu est fortement trouble. Une amorce d'anneau cerne la surface du liquide. Les corps microbiens s'accumulent au fond du tube, donnant un dépôt jaune orangé.

Sur gélose nutritive. Après douze heures d'étuve à $+28^{\circ}\text{C}$, les colonies ne sont visibles qu'à la loupe. Elles sont rondes, à bord régulier, légèrement jaunâtres ; vers la vingt-quatrième heure, elles sont à peine perceptibles à l'œil nu. Au bout de quarante-huit heures, elles ont $1,5$ à 2 mm de diamètre. Elles ont une surface lisse, bombée, luisante. Les bords sont réguliers. Elles ont une couleur jaune orangé. Le pigment ne diffuse pas dans le milieu. Ces colonies adhèrent normalement à la gélose sans la digérer, collent fortement à l'anse ayant servi à les prélever et présentent une consistance cireuse. Ceci rend difficile

leur émulsion dans les milieux liquides. Une odeur nauséabonde de vieux fromage se dégage de la culture.

La pigmentation des colonies devient plus intense avec le temps et surtout à la température du laboratoire (18 à 20° C). Vues par transparence à la loupe, les colonies présentent de très fines granulations réparties dans toute leur masse.

Sur gélose profonde de Veillon, les colonies se développent surtout dans la zone d'aérobiose sous forme de lentilles pigmentées.

Sur gélose hypersalée à 75 p. 1 000 de NaCl la culture ne se développe pas.

Sur pomme de terre la culture est abondante. La pigmentation est intense.

Sur bouillon végétal (pomme de terre-carotte) la culture est normale.

Sur gélose pomme de terre-carotte le germe se développe normalement, mais produit peu de pigment.

Sur gélose au sang humain il n'y a pas d'hémolyse.

Le petit lait tournesolé est alcalinisé en trente-six heures.

Sur milieux biliés (bouillon ou gélose) la culture est lente mais abondante en trois jours.

III. — CARACTÈRES BIOCHIMIQUES.

1° Métabolisme des glucides.

C'est un germe très faiblement glucidolytique.

En quatre jours il ne fermente que le glucose, sans gaz.

Le xylose, l'arabinose, le rhamnose, le galactose, le mannitol, le dulcitol, le lactose, le maltose, le saccharose, l'adonite, l'inosite, le lévulose ne sont pas touchés.

Le milieu de Stern (glycérine) n'est pas modifié. L'esculine n'est pas virée. La cellulose et l'amidon ne sont pas attaqués.

2° Action sur l'urée.

Ce germe possède une uréase peu active. L'urée sur milieu urée-indole, ou sur milieu de Christensen, n'est utilisée que le sixième jour.

3° Métabolisme des protéines.

En eau peptonée, ce germe est faiblement indologène. Il n'y a pas production d'hydrogène sulfuré ou d'ammoniaque.

La protéolyse de la gélatine (milieu gélose-gélatine en boîte de Petri) est importante en quarante-huit heures.

Le sérum de cheval coagulé commence à être digéré vers le troisième jour.

Le blanc d'œuf coagulé est attaqué lentement.

Le lait gélosé en boîte de Petri est fortement attaqué en quarante-huit heures.

Le lait en tube n'est pas coagulé, mais vers le sixième jour il se produit un début de peptonisation. Ce phénomène augmente avec le temps. Consécutivement à ce processus de protéolyse, le milieu prend une coloration jaune pâle. A la lampe de Wood on observe une fluorescence jaune verdâtre.

4° *Action sur le citrate de NaOH.*

Le citrate de soude sur milieu de Simmons n'est pas utilisé.

5° *Pouvoir réducteur.*

Les nitrates sont réduits en nitrites d'une façon importante et rapide (dix heures); vers le troisième jour il est difficile de mettre en évidence des traces de nitrites, mais on peut révéler la formation abondante d'ammoniaque.

Le rouge neutre vire au jaune orangé en vingt-quatre heures.

Le lait au bleu de méthylène commence à être réduit vers le cinquième jour.

6° *En milieu de Clark et Lubs.*

La réaction au rouge de méthyle est négative.

Par la réaction de Baritt on met en évidence des traces d'acétyl-méthyl-carbinol.

7° *Propriétés biochimiques particulières.*

Ce germe ne désamine pas le tryptophane sur milieu urée-indole. Il présente les réactions des catalases et des peroxydases négatives, celle des oxydases est positive.

Sur milieu au jaune d'œuf de Mac Lung modifié par Colmer, il se montre pourvu d'une lécithinase active.

Il donne une culture visible en vingt-quatre heures sur milieu de Braun au KCN.

IV. — PROPRIÉTÉS PHYSIOLOGIQUES.

1° *Chromogénèse.*

La pigmentation est favorisée par une température de + 18° C à + 25° C. Elle se produit encore à la température de + 4° C. Certains milieux sont très favorables à ce processus. C'est ainsi que le sérum de cheval coagulé, la pomme de terre glycinée ou bicarbonatée, le milieu à l'amidon, le milieu à l'œuf, le milieu gélose-gélatine, la gélose au lait, le milieu à la glycérine de Gessard augmentent le processus de chromogénèse.

2° *Résistance.*

Ce germe est peu résistant à la chaleur. Des températures de + 80° C pendant une minute, + 60° C pendant cinq minutes,

+ 56° C pendant dix minutes suffisent pour le tuer. Sur gélose inclinée à la température du laboratoire, il demeure vivant pendant deux mois, à la glacière pendant au moins six mois.

Il est sensible aux antiseptiques ordinaires : le sublimé au 1/100 000, le permanganate de K, les crésyls, les ammoniums quaternaires au 1/1 000, l'eau de Javel au 1/10 000 ont un effet bactéricide.

Action des sulfamides. Le para-aminophényl-sulfamide et l'adiazine ont une action bactériostatique puissante sur *Empedobacter*. Il est moins sensible au thiazomide et au rufol.

Action des antibiotiques. La carbomycine, la spiramycine, l'auréomycine, la streptomycine sont parmi les plus actifs.

V. — VIRULENCE ET POUVOIR PATHOGÈNE EXPÉRIMENTAL.

Dans toutes nos expériences, l'inoculum qui servit à étudier le pouvoir pathogène expérimental du germe était constitué par la suspension en sérum physiologique stérile d'une culture de 24 heures sur gélose inclinée. Le titre de cette suspension était de 10⁹ germes au centimètre cube.

Des quantités de 1 cm³, 0,5 cm³, 0,20 cm³ furent injectées à des animaux par voie péritonéale.

a) *Mammifères.* Rat d'élevage (*Rattus norvegicus* Berk var. *albinus*). Souris d'élevage (*Mus musculus* L. var. *albinus*).

b) *Poissons* (2). Tanche (*Tinca vulgaris* Cuv.). Carassin *Carassius auratus* L.). Gardon (*Leuciscus erythrophthalmus* L.). Goujon (*Gobio fluviatilis* Cuv.). Ablettes (*Alburnus lucidus* A. F.).

Les goujons, les gardons et les ablettes moururent en vingt-quatre heures. Tous les autres se montrèrent réfractaires à l'infection. Ceci met en évidence le fait suivant : les poissons qui dans la nature sont sensibles à l'infection se montrent également sensibles à la maladie expérimentale. Il y a donc là une question d'espèce (3).

VI. — POSITION TAXINOMIQUE.

Le germe que nous venons de décrire étant une bactérie immobile et chromogène appartient au genre *Empedobacter*. Il existe une espèce tout à fait proche de notre bactérie ; il s'agit d'*Empedobacter balustinum* [3] décrit en 1929 par Harrison sous le

(2) Le milieu ambiant était à la température de + 5° C.

(3) Notre étude expérimentale aurait dû porter sur des vandoises. Nous avons dû y renoncer, ces poissons étant très difficiles à trouver dans le commerce.

nom de *Flavobacterium balustinum*. Les caractères majeurs sont identiques, la seule différence entre les germes réside dans leur action sur le lait. La bactérie décrite par Harrison acidifiait lentement le lait, la nôtre alcalinise légèrement le milieu. On ne peut sur ce simple caractère créer une espèce nouvelle.

Nous avons encore ici un exemple frappant de microbes tout à fait proches, appartenant à la même espèce, dont certains représentants ont été isolés du milieu marin (c'est le cas du germe de Harrison, isolé d'écailles de poisson pêchés dans l'Océan Pacifique), et de poissons d'eau douce comme celui que nous décrivons.

En définitive, le microbe des poissons de la Dordogne n'est autre qu'une variante dulçaquicole d'*Empedobacter balustinum* [4]. Cette étude nous a permis de compléter les caractères biologiques et culturels de l'espèce.

RÉSUMÉ.

Les auteurs isolent du sang du cœur de vandoises (*Leuciscus leuciscus* var. *rostratus*), parasitées par un Copépode (*Tracheliastes polycolpus*), cinq germes : *Empedobacter balustinum*, *Flavobacterium vadosum*, *Flavobacterium lacunogenes*, un diplocoque et un staphylocoque (non identifiés).

Dans cet article les auteurs décrivent en détail la morphologie, les caractères culturels et biochimiques d'*Empedobacter balustinum*. Des inoculations pratiquées sur différents animaux mettent en évidence son caractère pathogène spécifique.

SUMMARY

STUDY OF THREE BACTERIAL STRAINS (*Pseudomonadaceae* GROUP)
THE SYNERGISM OF WHICH INDUCES A SEPTICEMIC DISEASE
IN « WHITE FISHES » OF THE DORDOGNE AND LOT RIVERS
AND OF THEIR TRIBUTARIES.

From heart blood of *Leuciscus leuciscus* var. *rostratus*, parasited by a Copepod (*Tracheliastes polycolpus*), the authors have isolated five germs : *Empedobacter balustinum*, *Flavobacterium vadosum*, *Flavobacterium lacunogenes*, a diplococcus and a staphylococcus.

In the present paper they describe in detail the morphology, cultural and biochemical properties of *Empedobacter balustinum*. The germ has been inoculated into various animals, and its specific pathogenicity has been demonstrated.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] VIVIER (P.). Communication présentée au *Congrès pour l'A. F. A. S. de Périgueux*, 1957 (à paraître).
 - [2] TYSSET (C.), VACHER (B.) et DENÈFLE (J.-P.). *Rev. Corps vétér. Armée*, 1958, **43**, n° 2, 54.
 - [3] BRISOU (J.). *Microbiologie du milieu marin*. Flammarion, édit. Paris, 1955.
 - [4] BRISOU (J.). *Étude de quelques Pseudomonadaceae. Classification*. Le François, édit., Paris, 1958.
-

ÉTUDE DE LA SENSIBILITÉ AUX ANTIBIOTIQUES D'UNE SOUCHE DE BACILLE DE WHITMORE

par G. MOUSTARDIER, Ch. DULONG DE ROSNAY et J. SALVAT (*).

(Laboratoire de Bactériologie de la Faculté de Médecine
et de Pharmacie de Bordeaux)

De nombreux travaux récents ont précisé l'action des antibiotiques sur le bacille de Whitmore [1 à 6]. De l'avis général, il semble que cette action soit assez limitée et que, seules, les tétracyclines et, surtout, le chloramphénicol aient une certaine activité antibiotique sur ce germe, aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Nous rapportons l'étude de la sensibilité aux antibiotiques d'une souche de *Malleomyces pseudo-mallei*, qui tire son intérêt :

a) D'une part, du fait que le germe a été isolé à plusieurs reprises de diverses localisations chez un malade atteint d'une mélioïdose chronique, évoluant depuis plusieurs années, et qui a été soumis à plusieurs reprises à une thérapeutique antibiotique ;

b) D'autre part, de ce que nous avons pu faire, sur les dernières souches isolées de ce malade, l'étude *in vitro* des associations d'antibiotiques. Isolée chez un malade qui avait déjà reçu des sulfamides et du chloramphénicol au cours d'hospitalisations à Saïgon et à Marseille, la première souche nous fut confiée en 1950 par le Dr Péne ; elle provenait d'une fistule, séquelle d'un abcès de la cuisse.

Elle fut testée vis-à-vis de quelques antibiotiques par la méthode des dilutions. Les résultats obtenus après vingt-quatre heures d'étuve sont rapportées dans le tableau I.

Le malade est alors traité par l'auréomycine dont il absorbe 154 g en trois cures, suivies d'une amélioration clinique importante.

Au mois de décembre 1957, le malade, jusque-là bien portant, fait une rechute et nous isolons de ses urines une souche de bacille de Whitmore qui tue le cobaye en quatre jours.

Le 10 janvier 1958, nouvel isolement du germe, cette fois-ci

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 5 février 1959.

à partir du liquide de ponction d'une nodosité apparue au creux poplité gauche.

Le malade est traité par la terramycine, sans effet notable.

Le 23 janvier 1958, nouvel isolement du germe par uroculture ; le malade est mis à la tétracycline (2,50 g *pro die*) jusqu'au 13 février. Amélioration.

Le 31 mars, rechute ; le malade fait un abcès de la prostate ; isolement du germe à partir d'une goutte de pus urétral. Reprise de la tétracycline.

TABLEAU I.

	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	Sensibilité après 24 h.
Strepto- mycine.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+ de 100 µg/cm ³
Auréo- mycine.	0	0	0	0	0	0	0	±	+	Début d'inhib. 0,78 µg Inhib. totale 1,56 µg
Chloram- phénicol.	0	0	0	±	+	+	+	+	+	Début d'inhib. 12,5 µg Inhib. totale 25 µg
Mycosine.	0	0	±	±	+	+	+	+	+	Début d'inhib. 25 µg Inhib. totale 50 µg

Ces quatre souches ont été testées vis-à-vis des antibiotiques par les méthodes de diffusion et de dilution. Les résultats ont été identiques pour toutes les souches et nous ne rapporterons que les résultats globaux.

1° Un premier test d'orientation par la méthode des disques a montré que, vis-à-vis des sulfamides, nos souches de bacille de Whitmore étaient sensibles au Septoplix et au Rufol, et résistantes à la Thiazomide, à l'Adiazine et à la Furadoïne.

Parmi les antibiotiques proprement dits, seuls étaient actifs l'auréomycine, la tétracycline et le chloramphénicol ; la terramycine et la néomycine donnaient une faible zone d'inhibition, tandis que le germe se montrait résistant à tous les autres antibiotiques essayés : pénicilline, streptomycine, bacitracine, framycétine, érythromycine, spiramycine, carbomycine, kanamycine.

2° Pour plus de précision, nous avons refait les mesures de

sensibilité aux antibiotiques, en précisant non seulement la concentration bactériostatique, mais leur action bactéricide, par la numération des survivants selon la méthode de Chabbert. Les résultats sont résumés dans le tableau II.

Ces résultats confirment ceux obtenus par la méthode de diffusion. La novobiocine, les tétracyclines et le chloramphénicol sont les seuls antibiotiques actifs sur nos souches de bacille de Whitmore. La néomycine et la kanamycine n'agissent qu'à des concentrations relativement élevées. Les autres antibiotiques sont sans activité.

TABLEAU II.

	Concentrations en antibiotiques en $\mu g/cm^3$												
	Action bactériostatique	Action bactéricide - Pourcentage de survivants											
		100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,78	0,39	0,19	0,09	
Novobiocine	3,12 - 1,56	0,01	0,1	0,1	1	1	1	10	100 %				
Auréomycine	3,12 - 1,56	0	0	0	0	0	0,01	0,1	10	100 %			
Terramycine	6,25 - 3,12	0	0	0	0	0,1	10	50	100 %				
Tétracycline	6,25 - 3,12	0	0,01	0,01	0,01	1	10	100 %					
Chloramphénicol	12,5 - 6,25	0,01	0,1	0,1	1	100 %							
Néomycine	50 - 25	10	10	100 %									
Kanamycine	100 - 50	0,1	1	100 %									
Streptomycine	résiste à + de 100 μg			100 %									
Magnamycine	"			100 %									
Bacitracine	"			100 %									
Polymyxine	"			100 %									
Oléandomycine	"			100 %									
Cyclosérine	"			100 %									
Erythromycine	"			100 %									
Spiramycine	"			100 %									
Penicilline U.O.	25 - 12,5	0	0,01	10	100 %								

3° Ces résultats nous ont incités à rechercher l'action de quelques associations d'antibiotiques.

Notre étude a porté essentiellement sur trois antibiotiques : la tétracycline, l'oléandomycine et le chloramphénicol, en associations, en proportions variables.

Nos résultats sont rapportés dans le tableau III et exprimés en concentration totale d'antibiotique par millilitre.

L'association de 67 p. 100 de tétracycline base et de 33 p. 100 d'oléandomycine, commercialisée sous le nom de Sigmamycine, s'est montrée active et douée d'un pouvoir bactéricide net. En associant ces antibiotiques en proportions variables, il nous est

apparu que l'effet antibiotique était surtout fonction de la quantité de tétracycline présente dans le mélange.

L'oléandomycine et le chloramphénicol n'ont aucune action synergique.

Le chloramphénicol et la tétracycline semblent additionner leurs effets.

L'association chloramphénicol-Sigmamycine, en parties égales, se montre très active.

TABLEAU III.

Antibiotiques isolés ou associés	Concentrations bactériostatiques	Conc. bactériolytiques (pas de survivants) au mm ³
Sigmamycine.	6,25 µg	6,25 µg pas de sur vivants.
Tétracycline-Oléandomycine.	6,25 µg	12,25 µg " " "
Tétracycline-Sigmamycine.	3,12 µg	6,25 µg " " "
Oléandomycine-Sigmamycine.	12,5 µg	12,5 µg " " "
Oléandomycine-Sigmamycine-Tétracycline.	25 µg	25 µg " " "
Chloramphénicol-Oléandomycine.	50 µg	50 µg " " "
Chloramphénicol-Sigmamycine.	3,12 µg	6,25 µg " " "
Chloramphénicol-Tétracycline.	6,25 µg	12,5 µg " " "
Chloramphénicol-Oléandomycine. } Tétracycline-Sigmamycine. }	1,56 µg	3,12 µg " " "

Mais le mélange le plus efficace, *in vitro*, paraît être l'association chloramphénicol + oléandomycine et tétracycline + Sigmamycine, qui correspond à une proportion de :

25 p. 100 de chloramphénicol,

33,5 p. 100 d'oléandomycine,

41,5 p. 100 de tétracycline.

Enfin, il paraît intéressant de signaler que les souches isolées d'un malade qui, au cours de sa longue évolution, a été traité par les sulfamides, le chloramphénicol et les tétracyclines, n'ont pas acquis de résistance, et que la sensibilité aux antibiotiques était identique pour les germes isolés de foyers différents.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

Nous avons fait l'étude antibiotique de souches du bacille de Whitmore isolées à différents moments de l'évolution d'une mélioïdose chronique.

Le chloramphénicol, les tétracyclines et la novobiocine paraissent être les antibiotiques les plus efficaces.

Quelques associations d'antibiotiques ont été étudiées.

Malgré les nombreux traitements suivis par le malade, nous n'avons pas constaté de résistance aux antibiotiques des souches les plus récemment isolées.

SUMMARY

STUDY OF SENSITIVITY TO ANTIBIOTICS
OF A STRAIN OF WHITMORE BACILLUS.

Study of the sensitivity to antibiotics of different strains of Whitmore bacillus at various stages of a chronic melioidosis.

Chloramphenicol, tetracyclins, and novobiocin seem to be the most efficient antibiotics. Certain associations of antibiotics have been studied.

In spite of the treatment administered to the patient, no resistance has been observed even in the last strains isolated from this patient.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BRYGOO (E. R.). *Bull. Soc. Path. exot.*, 1953, **46**, 169-172, 216-221, 347-353.
 - [2] BRYGOO (E. R.) et HENRY (E.). *Bull. Soc. Path. exot.*, 1953, **46**, 279-283.
 - [3] CHAMBON (L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 315-324, 466-471.
 - [4] CHAMBON (L.), LAJUDIE (P. DE) et FOURNIER (J.). *Bull. Soc. Path. exot.*, 1954, **47**, 139-153.
 - [5] FOURNIER (J.) et CHAMBON (L.). *La mélioïdose et le bacille de Whitmore*. Monographie de l'Institut Pasteur, Flammarion, édit., 1958.
 - [6] SALVAT (J.). *Thèse Médecine de Bordeaux*, 1958, n° 211.
-

A PROPOS DES EXAMENS HISTOLOGIQUES SYSTÉMATIQUES DES NÉVRAXES D'ANIMAUX MORDEURS

par R. BÉQUIGNON, G. SERGENT (*) et Ch. VIALAT (**)

(Avec la collaboration technique de M. COLLOMBIER et G. GAREAU).

*(Institut Pasteur, Service de la Rage
et Centre de Prélèvements biologiques, Paris)*

L'examen histologique systématique des névraxes des animaux mordeurs — au premier rang desquels se trouve évidemment le chien — a une valeur déjà signalée en 1913 par M^{me} Negri-Luzzani [1], sur laquelle P. Lépine [2] a insisté en 1938, et fait désormais partie de la prophylaxie antirabique. Un certain nombre de services antirabiques se bornent aux calques ou aux frottis de l'hippocampe, qui permettent avec la coloration de Sellers [3], d'identifier les inclusions spécifiques de Negri [4]. Mais l'histologie des coupes du névraxe (cerveau et ganglions plexiformes ou ganglions de Gasser) permet seule une appréciation complète et valable des lésions méningées, nerveuses et péri-vasculaires, c'est-à-dire de l'indication d'une prophylaxie antirabique opportune, surtout en période d'enzootie rabique, en limitant aux seules morsures vraiment suspectes les risques minimes mais réels de la sérothérapie ou de la vaccination antirabique [5].

Ces examens systématiques ont permis, en outre, d'identifier à coup sûr une manifestation nerveuse extrêmement fréquente chez les animaux domestiques, et cliniquement indiscernable, dans certains cas, de la rage : l'encéphalite due aux toxoplasmes.

Le microscope électronique [6] a définitivement écarté toute théorie « protozoaire » de la rage, à laquelle avait été conduit Negri par les formations histologiques qui portent son nom, sans permettre d'ailleurs de reconnaître une morphologie à un virus auquel les méthodes de filtration assigneraient un diamètre assez notable, 200 mμ. Mais leur aspect au microscope optique n'en reste pas moins pathognomonique. Et c'est le microscope

(*) D^r Vétérinaire, Fourrière Municipale, Paris.

(**) Manuscrit reçu le 26 janvier 1959.

optique qui avait permis de distinguer les corps de Negri de formations d'aspect bien analogue et décrites comme des protozoaires.

Toxoplasma gondii, décrit par Ch. Nicolle en 1908, a toujours vu son étude intimement mêlée à celle du virus rabique depuis le début de ce siècle, tant du point de vue pratique que du point de vue théorique. Il suffit, en effet, de rappeler les nombreux travaux sur la nature microsporidienne (*Encephalitozoon*, *Neurocytes*, *Nosema*, *Glugea*, *Negria*...) du virus rabique, en raison de l'aspect histologique des inclusions décrites par Negri, et de la similitude d'inclusions dans le tissu nerveux du chien ou du chat, que M^{me} Negri-Luzzani avait décrites dès 1913, précisément pour établir la distinction des corps de Negri et des formations de Sinigaglia, de Lentz ou de Manouélian. Les travaux publiés sur la rage par l'Organisation Mondiale de la Santé [7] signalent toujours à juste titre les images fallacieuses et le gros risque d'erreurs que représente une épizootie toxoplasmique chez la souris, animal universellement utilisé pour l'expérimentation. Tous les animaux à sang chaud peuvent d'ailleurs être touchés par cette parasitose : le chien est une espèce particulièrement atteinte, c'est en France un porteur chronique de *Toxoplasma gondii*, mais les manifestations nerveuses aiguës ou subaiguës de la parasitose sont, chez cet animal, particulièrement fréquentes [8].

La distinction taxonomique, souvent admise, quoique très discutée pour la plupart des auteurs, entre *Toxoplasma gondii* et *Encephalitozoon*, a été faite uniquement sur l'histologie des formations constatées, mieux, sur la chromatophilie des parasites, car les formes dites « *Encephalitozoon* » ne sont pas pathogènes pour l'animal. Le toxoplasma est basophile, l'*Encephalitozoon* oxyphile avec la coloration de Mann. On ne peut oublier que, dans le passé, les inclusions rabiques ont pu être rapprochées des *Encephalitozoon* en raison de leur morphologie au microscope optique, ni que de nombreuses publications ont signalé — et signalent toujours —, à juste titre, des corps de Negri « bleus », basophiles, dans certaines souches, dont la nature rabique est indiscutable.

Il convient, d'autre part, de rappeler que presque tous les auteurs s'accordent à identifier toutes les espèces du genre *Toxoplasma* décrites et dénommées selon l'espèce animale vecteur, et à ne retenir (révérence exige) que *Toxoplasma gondii*.

Or, il est fréquent de constater chez le chien, plus encore chez le chat, des inclusions oxyphiles cytoplasmiques, principalement dans les cellules ganglionnaires, de morphologie souvent très analogue à celle du corps de Negri ; mais l'inoculation à l'animal (le furet) ne détermine chez cet animal éminemment réceptif aucune lésion de maladie de Carré, à laquelle on aurait pu attribuer ces images d'*Encephalitozoon* (ou *Negria canis*) type Lentz.

Il est constant chez le chat de voir les mêmes images dans les cellules cérébrales.

Chez l'un et l'autre animal, il ne s'agit pas de rage ; ces formations voisinent souvent avec des éléments toxoplasmiques typiques ou des inclusions nucléaires oxyphiles.

Et l'on est conduit à envisager l'intervention de phénomènes chimiques, sans faire intervenir deux genres différents et peut-être plus hypothétiques que réels, au nom de la seule affinité tinctoriale. Or, il est cliniquement difficile d'affirmer la nature

LÉGENDE DE LA PLANCHE

FIG. 1. — Ganglion de Gasser (chien n° 69). Inclusions oxyphiles dans une cellule dégénérée. Gr. 950.

FIG. 2. — Ganglion de Gasser (chien n° 256). Inclusions nucléaires et cytoplasmiques, oxyphiles et basophiles. Gr. 950.

FIG. 3. — Ganglion de Gasser (chien n° 681). Nombreuses formations corpusculaires oxyphiles, plus ou moins arrondies, dans une cellule noble où toute architecture a disparu. Gr. 950.

FIG. 4. — Cerveau (chien n° 256). Cellule pyramidale avec deux toxoplasmes, formations corpusculaires du noyau et du cytoplasme ; histiocyte pseudo-kystique, au-dessus du pôle supérieur. Gr. 950.

FIG. 5. — Cerveau (chien n° 437). Cellule pyramidale, en voie de dégénérescence, avec deux histiocytes pseudo-kystiques à son pôle supérieur. Gr. 950.

FIG. 6. — Cerveau (chat n° 408). Deux pseudo-kystes, dans la couche superficielle de la pie-mère épendymaire. Gr. 950.

FIG. 7. — Cerveau (chat n° 443). Amas basophiles corpusculaires dans la couche externe de la corne d'Ammon, où tous les noyaux cellulaires ont disparu. Gr. 950.

FIG. 8. — Cerveau (truie n° 392). Toxoplasme à l'intérieur d'un vaisseau. Gr. 1 800.

FIG. 9. — Moelle dorsale (tœckel). Toxoplasmes dans le tissu de soutien extradure-mérien, au voisinage immédiat d'une hématomyélie. Gr. 360.

FIG. 10. — Œil (truie n° 392). Toxoplasmes dans une artériole de la choroïde ; histiocytes parasités au-dessus de la couche pigmentaire rétinienne. Gr. 950.

FIG. 11. — Œil (truie n° 392). Toxoplasmes et histiocytes de la rétine.

FIG. 12. — Œil (truie n° 392). Toxoplasmes et histiocytes de la rétine.

FIG. 13. — Cerveau (truie n° 392). Toxoplasmes en rosace, dans la corne d'Ammon. Gr. 950.

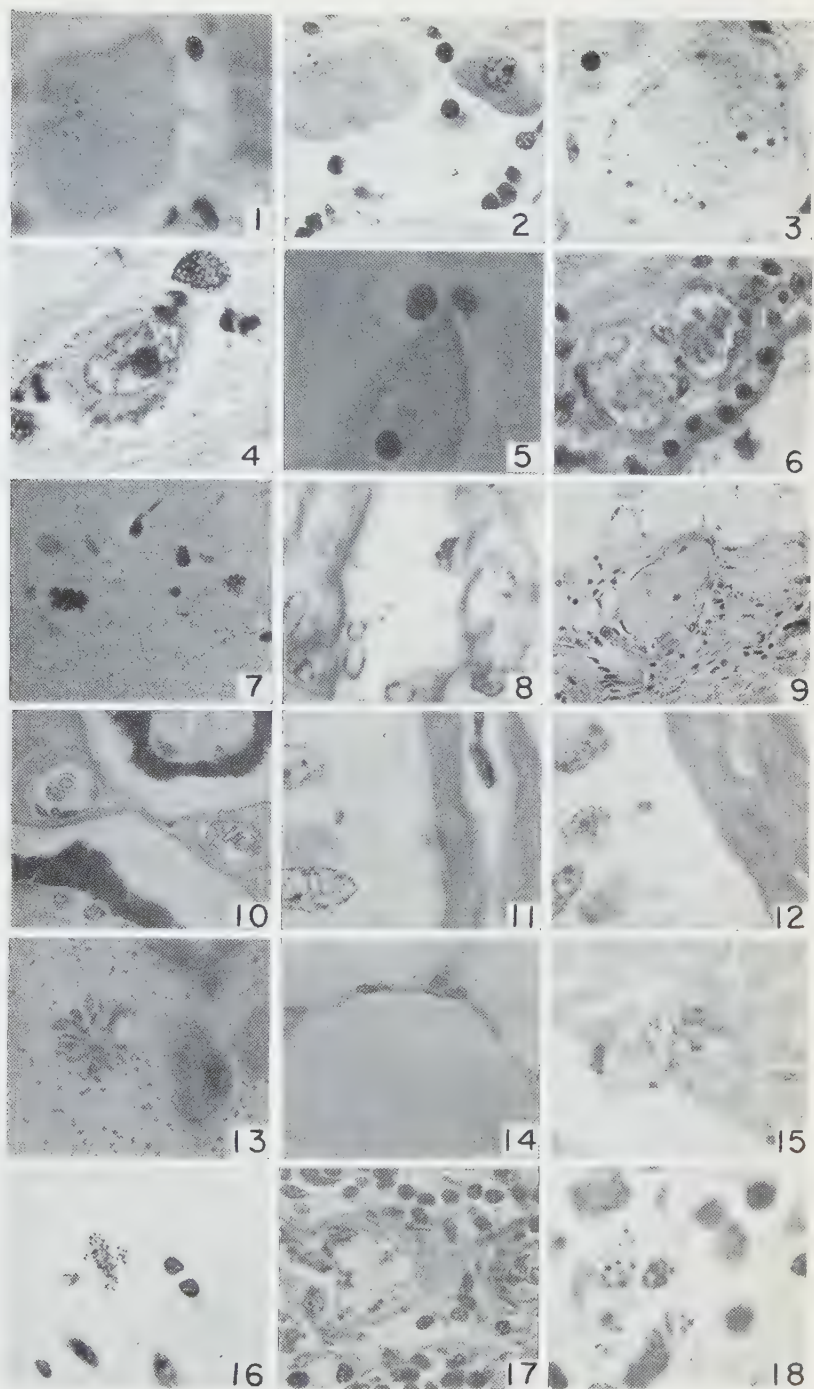
FIG. 14. — Poumon (chien 426). Histiocyte bourré de corpuscules toxoplasmiques dans la paroi alvéolaire. Gr. 950.

FIG. 15. — Utérus (chienne n° 334). Amas corpusculaire toxoplasmique. Gr. 950.

FIG. 16. — Cotylédon placentaire (chienne n° 745). Amas corpusculaire. Gr. 950.

FIG. 17. — Estomac (truie n° 392). Nombreux amas corpusculaires dans les cellules glandulaires. Gr. 950.

FIG. 18. — Rate (chien n° 422). Formations corpusculaires toxoplasmiques dans un granulome sous-séreux de la pulpe blanche. Gr. 1 800.





de cette affection encore que l'irascibilité de chiens dits « nerveux », les troubles digestifs, la kératite et une splénomégalie constante puissent l'évoquer [9].

L'examen histologique du névraxe (étant bien entendu qu'il s'agit d'un animal mort naturellement) [10] permet une distinction très nette des lésions, même (et ce fut souvent le fait au cours de la récente épizootie rabique) au cas où la rage survient chez un animal toxoplasmique ; mais presque toujours l'histologie ne permet, chez le chien mordeur en France, que de constater une encéphalite aiguë ou une poussée d'encéphalite à toxoplasmes (sans aucune lésion d'une autre étiologie) ; c'est également la règle chez le chat, mais on voit aussi ces formations dans les névraxes de bovins, de lapins, de visons, de singes, de moutons et de porcs.

La toxoplasmose nerveuse peut revêtir des aspects très différents, allant de la simple parasitose à l'encéphalite aiguë et généralisée. Chez le tœckel la complication revêt une forme très spéciale : l'hématomyélie (avec toxoplasmes « adultes » fourmillant dans le caillot qui remplace tout un segment de la moelle [11]).

A vrai dire, et comme tous les auteurs qui ont eu à examiner, soit chez l'homme, soit chez l'animal, des coupes de toxoplasmose nerveuse l'ont maintes fois précisé, les phénomènes inflammatoires sont toujours très limités à quelques cellules monocytaires, ou plasmocytaires : il s'agit exceptionnellement de polynucléaires. La méningite corticale est très rare et toujours localisée ; par contre, on constate presque toujours au niveau des septums un épaississement des méninges, et c'est aux dépens des cellules de cet épithélium que se forment le plus souvent les pseudo-kystes classiques, qui, rompus, laissent se répandre les formes classiques du protozoaire.

Il n'existe pas de périvascularite ; les lésions artérielles observées sont des lésions de l'endothélium vasculaire, avec grosses cellules histiocytaires bourrées de corpuscules toxoplasmiques, ou cellules de paroi ; souvent, on aperçoit des histiocytes qui ont traversé les tuniques et sont situés dans la gaine vasculaire, avant de se répandre dans le parenchyme voisin. C'est toujours, en effet, au voisinage des vaisseaux, et dans les régions les plus vascularisées que l'on rencontre le plus d'amas corpusculaires de cette parasitose à diffusion sanguine : ceux-ci se forment aux dépens des cellules névrogliques avec un aspect arborescent très caractéristique, ou celui de véritables astrocytes prenant intensément la coloration basophile ; lorsqu'ils atteignent les cellules nerveuses, où les toxoplasmes peuvent constituer des pseudo-kystes, il semble que le développement soit accéléré par un facteur X et l'on constate le plus souvent la libération et le développement de formes classiques, « adultes » du protozoaire, qui

apparaissent dans le noyau ou le cytoplasme en voie de dégénérescence, et laisseront à la place de la cellule une lacune où l'on n'aperçoit que rarement un toxoplasme adulte ou un macrophage.

Jamais nous n'avons observé de concrétions calcaires analogues à celles qui ont été signalées à maintes reprises dans les cerveaux parasités de nouveau-nés humains, et qui, opaques aux rayons X, sont décelables sur les radiographies craniennes, mais chez l'animal on peut voir sur les coupes histologiques tous les aspects anatomo-pathologiques, de la simple parasitose jusqu'à l'encéphalite aiguë.

Et ces formations ne sont pas localisées uniquement dans le système nerveux des animaux parasités ; on les retrouve presque toujours dans les autres systèmes tissulaires de l'animal, qu'il s'agisse des téguments (truffe, peau), des organes pulmonaires (poumons), cardiaques (myocarde), digestifs (rate, foie, ganglions mésentériques, tube digestif dans toute son étendue), génitaux (testicules, pénis, matrice et ovaires) ou de l'œil ; on les retrouve également dans les fœtus des femelles gestantes parasitées : et d'ailleurs, la manifestation aiguë de la parasitose est souvent exclusivement d'ordre digestif, ou pulmonaire, ou génital, en l'absence de toute manifestation nerveuse, ou seulement avec de légers accidents que l'on doit rechercher dans les antécédents souvent lointains de l'animal.

La toxoplasmose nerveuse est presque toujours la manifestation aiguë, habituellement, mais non toujours mortelle, d'une parasitose chronique et ce, sous l'influence de facteurs non précisés, mais elle ne s'accompagne presque jamais de lésions inflammatoires aiguës. L'inflammation, si elle existe, ne se traduit que par quelques lymphocytes, plus souvent par de grands mononucléaires, exceptionnellement par des polynucléaires éosinophiles. Lorsque la coupe montre, souvent chez un chien âgé ayant fait plusieurs accès encéphalitiques au cours de sa vie, un aspect lacunaire au niveau des noyaux centraux du névraxe, c'est à peine si l'on voit à la périphérie un ou deux macrophages ou plasmoctes. L'inflammation n'atteint que très rarement les méninges corticales, mais elle existe constamment au niveau des ventricules (3^e) et des septums, coïncidant avec la présence de pseudokystes chez les animaux porteurs de toxoplasmose chronique et de parasites libres à forme et morphologie « adultess ». Le protozoaire, sous sa forme classique, apparaît souvent dans le cytoplasme ou dans le noyau des cellules nerveuses, ganglionnaires ou cérébrales, ainsi que dans la lacune que la neuronophagie (ou le développement du toxoplasme aux dépens de la cellule) a laissée à la place de celle-ci. Nous avons vu que le protozoaire existe fréquemment, soit dans le système circulatoire, soit à l'inté-

rieur des vaisseaux, surtout lorsque la lumière de ceux-ci est plus ou moins obstruée par l'amas de cellules monocytaires ou histiocytes.

Les toxoplasmes envahissent la microglie et les neurones, d'autant plus que la région est plus vascularisée. L'atteinte de la cellule pyramidale se traduit par des lésions de dégénérescence et de dyschromatophilie du noyau et du cytoplasme. On doit sans doute y ranger les cas de bigémination du nucléole (plus fréquents au niveau du ganglion), mais la disparition de toute formation nucléaire et du nucléole lui-même, avec une coloration diffuse du noyau bleu estompé, s'accompagne rapidement de la dégénérescence cytoplasmique, sans qu'apparaisse aucune formation protozoaire à l'intérieur de la cellule. Au contraire, d'autres cellules nobles montrent une agglomération corpusculaire, basophile, soit intranucléaire, soit intracytoplasmique, sans altération de la texture ni de la transparence cellulaire. Ainsi, chez le chat par exemple, nous avons pu voir des assises entières de la corne d'Ammon, constituées de cellules où toute architecture nucléaire a disparu, dépourvues de nucléole, et le noyau remplacé par une agglomération de corpuscules basophiles, pseudo-kystes ou, comme les a nommés Cross [12] après Weinman, « colonies terminales » ; de telles formations, qui paraissent constituer un stade de résistance final où le parasite reste inactif pour un temps déterminé, sont fréquentes chez les animaux atteints de parasitose chronique, tant dans les parenchymes cérébelleux et cérébraux que dans les méninges des septums.

Mais au cours de la parasitose chronique, dans le système nerveux d'animaux en apparence normaux ou ayant présenté quelques manifestations nerveuses discrètes au cours de leur existence, la coloration de Mann (après fixation avec le sublimé acétique, mieux qu'après fixation au Bouin) met en évidence des formations basophiles, « arborescentes », très nombreuses, qui semblent formées par l'agrégat de corpuscules nettement distincts, beaucoup plus petits que ceux que contiennent les pseudo-kystes ; sans doute contenues dans des éléments névrogliaux, ces formations revêtent souvent l'aspect « astrocytaire » ; elles sont pour nous caractéristiques de la toxoplasmose chronique. Et à l'occasion de facteurs non encore précisés, il n'est pas rare d'apercevoir dans ces formations des foyers de développement où la morphologie et les dimensions des toxoplasmes deviennent celles du protozoaire classique. Ces formations ne sont pas propres au tissu nerveux, et de nombreux examens nous les ont montrées dans les téguments, les autres organes (rate, foie, ganglions lymphatiques), dans le tractus digestif, dans l'utérus. Il ne faut pas croire que la toxoplasmose soit une parasitose nerveuse. Si nous avons examiné plus souvent des névraxes, c'est seulement en

raison des encéphalites que nous avons plus spécialement en vue ; mais chaque fois que nous avons pu obtenir d'autres pièces d'un animal parasité nous avons vérifié que la toxoplasmose est toujours une infestation généralisée, dont la manifestation aiguë est plus fréquemment nerveuse mais peut tout aussi bien être d'un autre ordre.

C'est ainsi que nous avons pu voir la toxoplasmose à l'origine de broncho-pneumonie aiguë, chez le chien, le chat ou le porc ; d'ulcères gastro-intestinaux, avec perforation, non seulement chez le furet, mais aussi chez le chien et chez le chat ; de métrite aiguë, purulente, nécessitant l'ablation chez la chienne.

Une des lésions macroscopiques le plus fréquemment rencontrée consiste en un aspect grisâtre, vésiculeux, de l'extrémité distale de la rate, le long du bord libre de l'organe toujours augmenté de volume ; l'examen histologique montre qu'il s'agit, en réalité, de proliférations bénignes de la pulpe blanche, sous forme de granulomes qui apparaissent à travers la gaine péritonéale splénique.

Ainsi, il ne s'agit pas d'une affection rare, d'une curiosité, mais bien d'une des affections les plus communes, à l'heure actuelle, chez les petits animaux domestiques, en France : sur 488 cerveaux qui nous ont été soumis, dont 440 dans un état de conservation convenable, 383 permettaient d'attribuer à une toxoplasmose nerveuse les manifestations cliniques observées (tableau I). La rareté de son diagnostic tient certainement à la

TABLEAU I. — **Carnivores examinés au Service de la Rage (1956, 1957, 1958).**

	REÇUS	INUTILISABLES	EXAMINÉS	NORMAUX	RAGE	TOXOPLASMOSE
Chiens . .	385	43	342	16	31	295
Chats . .	103	5	98	8	2	88
Total. .	488	48	440	24	33	383

modestie des moyens dont nous disposons pour mettre en évidence la toxoplasmose. En effet, il est exceptionnel de constater le protozoaire dans le sang, ou dans un épanchement pathologique ; la recherche des anticorps sérologiques et de la toxoplasmolyse que met en œuvre la technique du « dye-test », décrit par Sabin, reste non seulement délicate, mais peu concluante, car faisant la preuve d'une toxoplasmose, elle ne prouve en rien que telle manifestation aiguë, pulmonaire, digestive ou nerveuse soit due au toxoplasme.

Et c'est encore l'inoculation intrapéritonéale du matériel à la

souris qui, faisant apparaître une ascite typique et où pullulent les protozoaires, nous a permis [13] et nous permet d'affirmer la nature toxoplasmique des lésions histologiques décrites ci-dessus. Il sied d'ailleurs de préciser que souvent plusieurs passages itératifs (rate) sont nécessaires avant d'obtenir l'ascite pathognomonique. Simitch [14] a insisté sur la réceptivité particulière de *Citellus citellus*.

L'intérêt de la souris est que les épizooties et la toxoplasmose chronique [15] qui confèrent une certaine immunité à l'animal sont encore assez rares dans les élevages. Il n'en est pas de même, désormais, pour les élevages de cobayes ou surtout de lapins où la contamination naturelle semble très fréquente ; et nous avons dû renoncer à une méthode employée il y a plusieurs années, qui consistait en l'inoculation intracrânienne au lapin du sang total d'un animal suspect, l'examen histologique permettant alors, en l'absence de signes cliniques d'infestation aiguë, de constater vers le quinzième jour des lésions de toxoplasmose nerveuse [16].

Le toxoplasme se multiplie en vingt-quatre heures dans les cultures de tissus [17] humains et animaux, mais à condition d'inoculer celles-ci avec des formes adultes du protozoaire telles qu'elles existent dans l'ascite péritonéale de la souris. Il est beaucoup plus difficile d'obtenir le développement des petites formes corpusculaires, pour lequel il serait souhaitable de disposer d'un facteur de croissance non encore précisé.

Dans le même ordre d'idées, on ne dispose guère d'une chimiothérapie active, en dehors des sulfamidés ou, mieux [18], des sulfones, et l'action des antibiotiques divers n'est que très restreinte ; ceux-ci ne servent jusqu'alors qu'à éviter toute contamination banale du matériel toxoplasmique, ceux-là permettent la survie de la souris inoculée et le développement de toxoplasmose chronique expérimentale ; on peut ainsi voir apparaître dans les cellules monocytaires d'un mince exsudat péritonéal, de petites formes corpusculaires absolument identiques à celles que l'on voit dans la toxoplasmose chronique.

Ainsi, en fin de compte, c'est par l'histologie qu'on peut le plus souvent déceler l'existence si commune de la toxoplasmose, et lui attribuer l'étiologie d'un certain nombre de manifestations cliniques, chez l'animal comme chez l'homme. C'est au nom de l'histologie qu'on peut envisager les rapports, sans doute intimes sinon exclusifs, avec la toxoplasmose, de bon nombre d'encéphalites, de myocardites, de pneumonies « interstitielles » [19] et envisager le rôle pathologique d'un protozoaire très répandu, dans des affections où les ultra-virus n'interviennent pas davantage que des germes plus qu'hypothétiques [20].

RÉSUMÉ.

L'examen histologique des névraxes d'animaux mordeurs fait désormais partie de la prophylaxie antirabique. Il a permis de reconnaître en outre la fréquence des encéphalites toxoplasmiques chez les animaux domestiques, très souvent parasités ; cette parasitose est aussi à l'origine d'accidents d'ordre très divers, au niveau de différents organes, mais se caractérise très nettement à l'examen histologique du névraxe, avec la coloration de Mann, utilisée pour l'identification des inclusions rabiques. Il apparaît que la plupart des « inclusions » décrites sous des noms divers ne sont en réalité que des aspects morphologiques de *Toxoplasma gondii*, à des stades différents de son évolution.

SUMMARY

CONSIDERATIONS ON A SYSTEMATIC HISTOLOGICAL STUDY
OF THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM OF BITING ANIMALS.

Histological examination of the brain is a general necessity in rabies prophylaxis. It has revealed the great frequency of toxoplasmic encephalitis among domestic animals, especially young ones ; the same parasitism may cause acute disease in other organs, but Mann's coloration always reveal the true nature of such disorders, as well as that of Negri bodies. Many of the so-called inclusions described and considered until now as being specific formations, in reality belong to *Toxoplasma gondii*.

★★

Nous tenons à remercier M. R. Grosset-Grange de l'aide technique précieuse apportée au cours de ce travail.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] NEGRI-LUZZANI (L.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1913, **27**, 1039.
- [2] LÉPINE (P.) et SAUTTER (V.). *Ann. Inst. Babes*, 1938, **9**, 123.
- [3] SELLERS (T. F.). *Am. J. publ. Hlth*, 1927, **17**, 1080.
- [4] NEGRI (A.). *Z. Hyg.*, 1903, **43**, 507, et **44**, 519.
- [5] FOX (J. P.). *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1958, **70**, 480.
- [6] CROISSANT (O.), LÉPINE (P.) et WYCKOFF (R. W. G.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 183.
- [7] JOHNSON (H. N.). *La Rage*, Monographie n° 23, O. M. S., Genève, 1955, 145.
- [8] GROULADE (P.), SERGENT (G.) et BÉQUIGNON (R.). *Bull. Acad. vét.*, 1956, **29**, 49.
- [9] GROULADE (P.), SERGENT (G.) et BÉQUIGNON (R.) [*loc. cit.*].

- [10] BÉQUIGNON (R.) et VIALAT (Ch.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1943, **69**, 372.
- [11] Travail en vue de recherches sur la maladie des tœckels effectué sur des pièces remises par M. le Dr F. Méry en 1942-1943 (inédit).
- [12] CROSS (J. B.). *J. inf. Dis.*, 1947, **80**, 278.
- [13] LOZACH (M.) et VIALAT (C.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 526.
- [14] SIMITCH (T.), PETROVITCH (Z.) et BORDJOCHKI (A.). *Arch. Inst. Pasteur Algérie*, 1956, **34**, 93.
- [15] LÉPINE (P.). *C. R. Soc. Biol.*, 1929, **100**, 262.
- [16] GROULADE (P.), SERGENT (G.) et BÉQUIGNON (R.). *Bull. Acad. vét. (loc. cit.)*.
- [17] CHERNIN (E.) et WELLER (T.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1954, **85**, 68.
- [18] GARIN (J.-P.). *Thèse Lyon*, 1953.
- [19] Communes à l'homme et aux animaux, et attribuées à *Pneumocystis carinii*. — Cf. DELANOUE (P.) et DELANOUE (M^{me} P.). *C. R. Acad. Sci.*, 1912, **155**, 658. — LE TAN VINH, *Arch. Fr. Pédiatr.*, 1954, **11**, 1035. — BOIDESCU (J.) et CORDUN (G.). *Presse méd.*, 1958, **66**, 913.
- [20] WEINMAN (D.). *J. inf. Dis.*, 1943, **73**, 85.

ÉTUDE SUR L'ANTIGÈNE SOLUBLE DU VIRUS RABIQUE

par J.-M. VILLEMOT et A. PROVOST (*).

(Laboratoire de Farcha, Fort-Lamy, Tchad)

I. — INTRODUCTION.

La spécificité des réactions sérologiques est déterminée par la nature chimique et l'agencement moléculaire de l'antigène et de l'anticorps qui s'unissent pour former un complexe. Cette spécificité est telle qu'elle permet d'observer des différences entre des protéines dont l'architecture molaire ne peut être appréciée par les méthodes de chimie analytique connues à ce jour. La sérologie est donc un instrument d'étude précis pour l'analyse structurale des protéines et des antigènes et, par suite, des particules renfermant de tels antigènes. Les virus, en tant que substances antigéniques, ont le désavantage sur les protéines telles que les diazo colorants, de ne pas présenter une concentration moléculaire élevée de petites particules, et sur les bactéries celui de posséder des particules virales inframicroscopiques. La mise en évidence dans le cas des virus d'une réaction sérologique visible semblait donc devoir faire appel à un mécanisme particulier. Mais Merrill [1] étudiant les relations existant entre l'activité sérologique d'un antigène et la taille et la concentration de celui-ci, établit un graphique en fonction de la masse de chaque particule en mg et du nombre de particules par ml (concentration) nécessaires pour obtenir une réaction visible : agglutination, floculation ou précipitation. Les conclusions de Merrill peuvent être extrapolées aux virus les plus petits ; ainsi par exemple Smith et coll. [2] ont mis en évidence une réaction de floculation avec le virus de la poliomyélite, obtenu à partir de cultures de tissu et concentré par ultracentrifugation.

La méthode d'analyse immunochimique d'un mélange antigénique par la réaction de précipitation en milieu gélifié, qui a été décrite par Oudin, puis reprise par Ouchterlony, a été largement exploitée dans l'étude des virus humains et animaux. Ceux-ci pré-

(*) Société Française de Microbiologie, séance du 8 janvier 1959.

sentent une structure antigénique complexe encore mal connue, mais il semble qu'ils possèdent presque tous une propriété commune : celle de donner d'une part un antigène corpusculaire viral de dimensions variables selon les virus, et d'autre part un antigène soluble qui constitue un facteur d'unité dans le groupe des virus. L'antigène soluble est lié en général à une protéine, peut-être une nucléo-protéine ; il est visible au microscope électronique et il présente cette caractéristique de présenter pour les virus une taille uniforme d'environ 10 m μ . Cet antigène soluble n'est pas solidement rattaché au virus et en est facilement dissociable. Les études portant sur l'antigène soluble ont eu trait à de nombreuses viroses humaines et animales. En ce qui concerne la rage, Polson et Wessels [3] ont pu mettre en évidence, dans des cerveaux de souris infectés par le virus rabique, un antigène soluble distinct de l'antigène viral d'une dimension de 12 m μ . Kipps et coll. [4], étudiant l'action comparée du phénol et de la chaleur sur l'antigène soluble de la rage, concluent que celui-ci est constitué par deux composants distincts ou par deux groupes fonctionnels de la même substance, mais que cette différence reste indéterminée. Recherchant une méthode diagnostique spécifique et rapide de la rage en appliquant la technique de diffusion en gélose d'Oudin - Ouchterlony, nous avons obtenu [5] deux lignes de précipitation spécifiques du virus rabique. Ceci rejoindrait l'hypothèse de Kipps et coll. Nous nous proposons ici de faire le point sur nos connaissances en ce qui concerne l'antigène soluble du virus rabique.

II. — LA RÉACTION DE PRÉCIPITATION APPLIQUÉE AU VIRUS DE LA RAGE.

Havens et Mayfield ont décrit en 1932 [6, 7, 8] un test de floculation du virus rabique, qui entre leurs mains se montrait spécifique. Le sérum antirabique que ces auteurs utilisaient était préparé sur lapin et ne flocculait ni avec le virus vaccinal, ni avec les virus encéphalitiques, contrairement à ce que d'autres auteurs avaient obtenu avant eux. De plus ce sérum ne flocculait pas une suspension de cerveau normal de lapin.

Nous avons repris la technique d'Oudin-Ouchterlony modifiée par Mansi [9] ; nous avons écrit en détail ailleurs [10] notre expérimentation qui a porté sur des cerveaux de lapin normaux et infectés par le virus fixe, et sur 44 cerveaux de chiens, 16 de chats, 2 de singes et 2 cerveaux humains, envoyés à notre service comme suspects de rage. La réaction de précipitation en gélose a montré deux immun-précipités pour 24 cerveaux de chien et un cerveau humain. Les examens classiques devaient par la suite confirmer le diagnostic de rage. Quoique la spécificité de la réaction ait été

fort incomplètement étudiée jusqu'ici, nous n'avons pas obtenu de réactions croisées vis-à-vis du virus de Carré. Le sérum antirabique que nous avons préparé sur ânes immunisés par des ino-

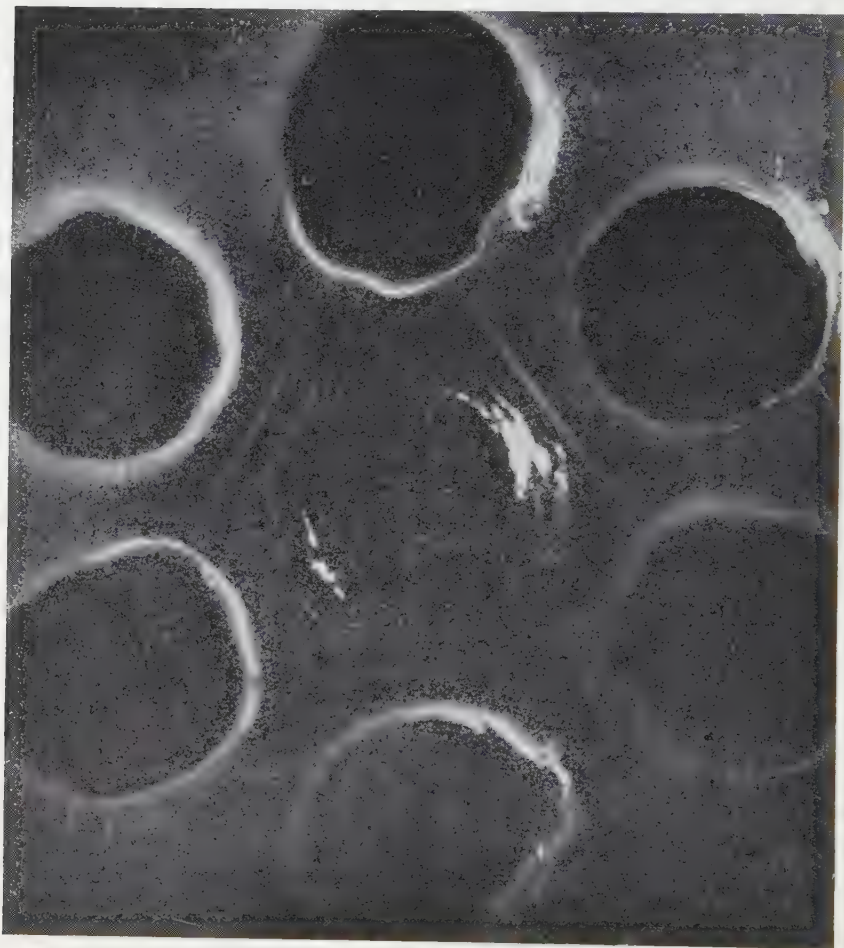


FIG. 1. — Lignes de précipitation obtenues avec du tissu cérébral de chien enragé. En face des témoins (cerveaux de chien normal) n'a lieu aucune précipitation.

culations de suspensions formolées de cerveaux de lapins (virus fixe frais) donne deux lignes de précipitation avec du cerveau de lapin normal et quatre lignes avec du cerveau de lapin inoculé de virus fixe. Havens et Mayfield ne mentionnant pas l'espèce ani-

male qui a fourni le matériel cérébral infecté par le virus fixe servant à l'immunisation des lapins donneurs de sérum, l'on peut penser qu'il s'agissait de lapin, et l'on s'étonne que ces auteurs n'aient pas obtenu de floculation avec des suspensions de cerveau normal de lapin.

Les deux lignes de précipitation spécifiques du virus rabique apparaissent presque rectilignes, avec une légère concavité dirigée vers le réservoir d'anticorps (fig. 1). La ligne qui est la plus proche du réservoir contenant le sérum et qui correspond à un composant particulière de dimensions plus petites, est très fine et moins distincte. Les travaux de Korngold et Van Leeuwen [44] qui ont établi une relation entre le poids moléculaire de l'antigène et l'incurvation de la précipitation permettent de penser que l'une des fractions aurait un poids moléculaire voisin de celui de l'anticorps et l'autre un poids moléculaire légèrement supérieur.

III. — STRUCTURE ANTIGÉNIQUE DU VIRUS RABIQUE.

L'étude antigénique d'un virus doit être conduite avec un esprit de synthèse en s'efforçant de reclasser celle-ci dans le domaine des virus en général. C'est pourquoi nous ferons souvent appel aux connaissances acquises pour d'autres virus. Selon Kipps et coll. une suspension de matériel rabique soumise à une centrifugation de 30 000 t/mn pendant cent dix minutes donne un surnageant « Antigène soluble » fixant le complément au même taux que la suspension initiale mais dont le titre infectieux est bas, et un culot « Antigène viral » dont le titre infectieux est supérieur à celui de la suspension de départ, mais dont le pouvoir à fixer le complément a considérablement diminué. Il est évident que des particules infectieuses restent dans le surnageant. La même technique de séparation appliquée au virus MEF1 de la poliomyélite par les mêmes auteurs donne des résultats comparables ; mais le surnageant soumis à deux centrifugations consécutives de 30 000 t/mn pendant cent dix minutes perd tout pouvoir infectieux, alors qu'il fixe le complément au même taux que la suspension originale. Virus rabique et antigène soluble sont tous deux susceptibles de susciter l'apparition d'anticorps neutralisants et fixant le complément à un taux comparable (Kipps et coll.). Il est particulièrement intéressant de relever dans les travaux de ces auteurs deux constatations :

a) L'antigène soluble du virus rabique traité par l'acide phénique à 0,5 p. 100 et incorporé dans un adjuvant composé de paraffine, de lanoline et de *Mycobacterium phlei*, induit la formation d'anticorps neutralisants et fixant le complément à un taux aussi

élevé que celui qui est obtenu avec l'antigène viral seul, ou avec un mélange des particules virales et de l'antigène soluble.

b) L'antigène soluble du virus rabique, après chauffage à 56° C pendant trente minutes, suscite l'apparition d'anticorps fixant le complément à un taux moindre, et d'anticorps neutralisants dont le titre a considérablement diminué (tableau I).

TABLEAU I. — (Emprunté à Kipps, Du Naudé, Polson, Selzer et van den Ende). Anticorps induits chez la souris adulte par les fractions antigéniques extraites de cerveaux rabiques de souriceaux à la mamelle.

ANTIGÈNE UTILISÉ POUR L'IMMUNISATION	TITRE EN ANTICORPS FIXANT LE COMPLÈMENT (1)	TITRE EN ANTICORPS NEUTRALISANTS (2)
—	—	—
Antigène soluble phéniqué .	160	320
Virus phéniqué.	320	320
Antigène soluble + virus . .	140	320
Antigène soluble chauffé . .	160	3,2
Virus chauffé	240	8
Antigène soluble + virus chauffé	240	15

(1) Le titre en anticorps fixant le complément est exprimé par l'inverse de la dilution la plus élevée de sérum donnant environ une fixation de 50 p. 100 en présence d'une concentration unique d'antigène.

(2) Le titre en anticorps neutralisants est exprimé par l'inverse de la dilution la plus élevée de sérum qui protège 50 p. 100 des souris recevant le mélange sérum + 100 DML de virus. Le test de neutralisation est pratiqué par voie intracérébrale sur des souris âgées de 3 à 4 semaines.

Kipps et coll. concluent que la différence de l'activité sérologique de l'antigène soluble traité soit par le phénol, soit par la chaleur, est due à la présence de deux composants distincts ou de deux groupes fonctionnels de la même substance, mais que cette différence reste indéterminée.

Nous avons soumis au test de précipitation du tissu cérébral de chien enragé, traité d'une part par du formol à 0,35 p. 100, et d'autre part par la chaleur (une heure à 56° C). Ayant remarqué que la digestion enzymatique des cerveaux virulents permettait une précipitation plus nette et plus distincte, nous avons au préalable soumis le matériel rabique à une trypsination. Au milieu gélosé que nous utilisons, et qui contient du méthyl-orange, nous avons ajouté 1 mg de bleu de méthyle en solution à 1 p. 100 pour 30 cm³ de milieu. A la suite des travaux de Crowle [42] nous avons observé que les traces de cadmium contenues dans le bleu de méthyle utilisé dans la proportion indiquée ci-dessus accélèrent la précipitation et que les lignes apparaissent plus distinctement. Le matériel rabique traité par la chaleur ne donne plus qu'une seule ligne de précipitation qui va rejoindre celle qui apparaît

le plus près du réservoir de sérum, en face de la suspension cérébrale virulente trypsinée. La même suspension antigénique traitée par le formol à 0,35 p. 100 ne donne elle aussi qu'un seul précipité, mais celui-ci correspond à la ligne de précipitation la plus proche du réservoir d'antigène. Le formol n'a donc pas d'action sur la fraction antigénique soluble dont la dimension est la plus grande, alors que la chaleur la détruit ; et inversement l'effet de la chaleur respecte les particules de plus petite dimension, qui sont détruites par le formol. Nous pouvons rapprocher ces résultats de ceux de Brown et Crick pour le virus de la fièvre aphteuse ; ces auteurs ont mis en évidence deux lignes de précipitation pour ce virus correspondant à des dimensions pour les particules antigéniques de 7 et 20 μ . Les particules de 7 μ sont détruites par le formol, et non par la chaleur, alors que l'inverse se produit pour les particules de 20 μ .

On ne peut déduire des travaux de Kipps et coll., du fait que la fraction soluble obtenue par une seule centrifugation différentielle renferme encore des particules virales, si l'antigène soluble agit en tant qu'antigène vrai ou en tant qu'haptène, qui ne serait alors sérologiquement actif qu'en présence de quantités infimes de particules virales. La non spécificité relative des antigènes solubles est bien illustrée par les expériences de Fulton et Dumbell [13] avec diverses souches du virus de la blue-tongue. Alors que des différences frappantes ressortent des tests de neutralisation de ces souches avec des antisérums préparés à partir de ces différentes souches, les antigènes solubles préparés par extraction à l'acétone-éther selon la méthode de Casals ne sont pas différenciables. L'extraction par l'eau physiologique montre des différences d'ordre quantitatif entre ces antigènes solubles. L'antigène soluble ne possède donc que la spécificité de type ; ainsi l'antigène S de la grippe est commun aux différents types de ce virus. Hoyle conçoit la particule infectieuse du virus grippal comme une masse de particules d'antigène soluble dans une enveloppe lipoïde dont la désintégration libère à la fois des antigènes solubles et des particules sphériques hémagglutinantes de 30 μ , de taille intermédiaire entre la particule virale (70 μ) et l'antigène soluble (10 à 15 μ). Les microphotographies électroniques faites par Reagan et coll. [14] montrent pour le virus rabique des particules sphériques de 100 à 120 μ ; on ne connaît pas encore les rapports de la particule virale avec l'antigène soluble, mais il semble que ce dernier ne serait pas étroitement lié à l'unité infectieuse.

L'action de divers facteurs physiques et chimiques a été essayée sur l'antigène soluble de la rage afin d'en éclaircir la nature. Van den Ende et coll. [15] ont montré qu'il résiste à de grandes variations de pH ; cependant à pH 4,3, l'antigène soluble est totale-

ment précipité dans la solution, et tout l'antigène n'est pas retrouvé par redissolution du précipité. Le chauffage à 56° pendant trente minutes, ou le traitement par le formol ou le phénol, ne modifient pas le pouvoir de fixer le complément (voir tableau I). Le comportement de l'antigène soluble du virus rabique a été étudié vis-à-vis de différents enzymes tels que la trypsine, la ribonucléase, la désoxyribonucléase, qui réduisent le titre de fixation du complément du tiers ou de moitié. Thompson [16], en vue de la préparation d'un vaccin expérimental pour la souris, a soumis cinq souches de virus des rues et la souche CVS de virus fixe à différents enzymes protéolytiques, dont le plus intéressant semble être la protéase 15, car non seulement elle réduit la proportion du virus actif de manière considérable, mais, à l'instar des autres enzymes utilisés par Thompson, elle présente cet avantage de ne pas être anticomplémentaire. La protéase 15 est extraite de bactéries par précipitation alcoolique; elle diminue la viscosité des protéines en suspension et augmente leur solubilité sans les dégrader jusqu'au stade d'acides aminés. L'inoculation intracérébrale à la souris de tissu cérébral rabique de lapin soumis à la protéolyse peut provoquer une réponse immunologique suffisante pour protéger contre l'épreuve de 4 DL₅₀ de virus homologue, dans le protocole expérimental suivi par Thompson. Thompson [17] estime à 99 p. 100 la diminution de la quantité du virus actif dans du tissu cérébral (virus CVS) soumis à la protéolyse par la protéase 15, par rapport au même tissu non traité. L'action de la protéase 15 ne permet pas d'obtenir une formation d'anticorps neutralisants aussi élevée, mais elle permet une fixation du complément à un titre aussi grand qu'avec du tissu cérébral non traité.

Des analyses électrophorétiques faites par Kipps et coll. [4] n'ont jusqu'ici montré aucune différence significative entre des émulsions de cerveaux de souris à la mamelle infectés de rage et ceux de souris normales du même âge. L'antigène soluble semblerait associé avec les constituants les moins mobiles lorsque l'électrophorèse est effectuée avec un tampon borate à pH 8,6.

IV. — DISCUSSION.

Le fait d'obtenir deux lignes de précipitation spécifiques du virus rabique lors de la diffusion en milieu gélifié est à rapprocher de la constatation faite par Kipps et coll., qui conduit ces auteurs à l'hypothèse de deux fractions antigéniques de l'antigène soluble. Cette conception évoque celle de la structure de l'antigène LS de la vacine dont justement une fraction est thermolabile, et l'autre thermostable. Mais cet antigène soluble LS ne suscite

pas la formation d'anticorps neutralisants, alors que l'antigène soluble de la rage non chauffé permet une telle immunisation. Si nous reprenons la terminologie LS pour désigner ce dernier antigène, la fraction thermolabile L serait responsable du pouvoir de provoquer la formation d'anticorps neutralisants et correspond aux particules les plus grosses, tandis que la fraction S, thermostable, de plus petite dimension, suscite l'apparition d'anticorps fixant le complément.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour tenter d'expliquer la présence de particules d'antigène soluble de dimensions différentes :

a) Les particules les plus grosses représenteraient des agglomérats de petites particules unies par liaison mécanique avec des composés lipidiques du tissu cérébral.

b) Elles seraient constituées par plusieurs unités plus petites liées par le simple jeu de forces de cohésion.

c) La dimension des particules serait liée aux différentes étapes de la synthèse intracellulaire du virus, si l'on admet le rôle précurseur des antigènes solubles.

d) Les particules les plus volumineuses présenteraient un édifice moléculaire différent.

Si nous replaçons cette étude dans le cadre des investigations portant sur les virus animaux, l'hypothèse de liaisons mécaniques de particules avec des substances tissulaires de taille variée est soutenue par le fait que l'antigène soluble de la blue-tongue, extrait du cerveau virulent de souris par la méthode de Casals à l'acétone-éther, est de dimension particulaire de $\pm 8 \text{ m}\mu$, alors que l'extraction par l'eau physiologique donne des particules fixant le complément de tailles intermédiaires entre $8 \text{ m}\mu$ et celle du virus infectieux (Fulton et Dumbell [18]). Dans certaines conditions, telles que l'extraction à l'acétone-éther, il y aurait libération d'unités de base à partir de complexes particulaires. Mais cette hypothèse peut difficilement expliquer les propriétés différentes des deux fractions, tant du point de vue des anticorps qu'elles induisent que de leur résistance à la chaleur. La deuxième hypothèse ne peut davantage élucider ce point. L'on pourrait alors concevoir que l'antigène soluble représenterait un stade dans la synthèse du virus et que l'antigène capable d'induire la formation d'anticorps neutralisants serait le stade préterminal conduisant à la particule virale infectieuse. Nous savons en effet que l'antigène soluble peut être relargué à partir de particules infectieuses du virus grippal purifié par traitement à l'éther ; de même pour le virus vaccinal, dont l'antigène soluble peut être extrait de la surface des corps élémentaires. De plus, l'antigène soluble de la vaccine est capable de susciter la formation d'anticorps qui non

seulement précipitent l'antigène soluble, mais peuvent agglutiner des suspensions de corps élémentaires. Les résultats des travaux de Hoyle [19, 20, 21] le conduisent à la conclusion que l'antigène soluble de la grippe est l'unité fonctionnelle de multiplication lors de la synthèse intracellulaire, et que c'est un constituant de la particule virale. Malgré cette argumentation, de nombreux auteurs pensent, du moins dans le cas des virus les plus petits, que l'antigène soluble ne serait pas toujours un constituant essentiel du virus. Le fait pour Kipps et coll. [4] de déceler par fixation du complément l'antigène soluble du virus MEF1 de la poliomyélite dans les cerveaux de souris à la mamelle infectés par ce virus, mais pas dans les cerveaux de souris adultes, leur fait penser qu'il ne peut s'agir là d'un précurseur du virus, ni même d'un élément matriciel. En outre, la rupture du virus rabique purifié, de même que celle du virus MEF1 purifié, ne relargue pas d'antigène soluble. Bien que van den Ende et coll. [15] mettent en évidence l'antigène soluble de la rage en même temps que le virus, les travaux de Ueki et coll. [22] ont montré que le virus infectieux était décelable un à trois jours avant l'antigène fixant le complément et trois à quatre jours avant l'apparition des corps de Negri, dans des cerveaux de souris inoculées par voie intracérébrale avec du virus des rues. L'antigène fixant le complément n'apparaît chez ces souris que lorsque le titre infectieux du matériel cérébral atteint $10^{-2,4}$ à $10^{-3,8}$ DL50 par 0,03 ml. Il semble donc, au moins pour le virus rabique, que l'antigène soluble est secondaire à la formation de l'unité infectieuse ; ce serait un produit caractéristique accompagnant la synthèse intracellulaire, sans pour cela être un constituant essentiel des particules virulentes. Reste donc l'hypothèse qui attribue aux particules les plus grosses de l'antigène soluble une architecture propre qui rendrait compte de ses caractéristiques.

V. — CONCLUSION.

La réaction de précipitation du virus rabique en milieu gélifié permet la mise en évidence de deux lignes de précipitation. A la lumière des travaux de Kipps et coll. qui pensent à deux composants de l'antigène soluble, il est vraisemblable que les deux immuns-précipités obtenus correspondent chacun à une fraction antigénique soluble différente. Une des fractions (particules les plus petites) résiste à la chaleur, et est responsable du pouvoir de provoquer la formation d'anticorps fixant le complément, alors que l'autre (particules les plus grosses) qui est thermolabile est capable d'induire l'apparition d'anticorps neutralisants. Le fait que l'antigène fixant le complément apparaisse après la formation

des particules virulentes laisse penser que l'antigène soluble n'agit pas en tant que précurseur du virus, non plus qu'en tant qu'élément matriciel. Une architecture moléculaire différente des deux fractions antigéniques solubles rendrait compte de leurs propriétés immunologiques et physico-chimiques propres.

SUMMARY

STUDIES ON RABIES VIRUS SOLUBLE ANTIGEN.

The precipitation reaction of rabies virus in gel medium shows two lines of precipitation.

Kipps and coll. have demonstrated in the brain of suckling mice infected with rabies virus the presence of a soluble antigen. It seems probable that the two lines of precipitation correspond to two distinct soluble antigenic fractions : one (the smallest particle) is thermostable, induces the formation of complement-fixing antibodies ; the other (the largest particle) is thermolabile and induces the formation of neutralizing antibodies.

The fact that the complement-fixing antigen appears after the formation of the virulent particle suggests that the soluble antigen is neither a precursor nor a template for the virus.

A different molecular arrangement of the two antigenic fractions would account for their immunologic and physico-chemical properties.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] MERRIL (M. H.). *J. Immunol.*, 1936, **30**, 169.
- [2] SMITH (W.), LEE (L. H.), SHEFFIELD (F. W.) et CHURCHER (G.). *Lancet*, 1956, **1**, 710.
- [3] POLSON (A.) et WESSELS (P.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1953, **84**, 317.
- [4] KIPPS (A.), DU T. NAUDE (W.), POLSON (A.), SELZER (G.) et VAN DEN ENDE (M.). *The size distribution of specific antigens in virus infected tissues, and their significance*, in *Ciba Foundation Symposium on the nature of viruses*, 1957.
- [5] VILLEMOT (J.-M.) et PROVOST (A.). *C. R. Acad. Sci.*, 1958, **246**, 2694.
- [6] HAVENS (L.-C.) et MAYFIELD (L.-R.). *J. Inf. Dis.*, 1932 a, **50**, 367.
- [7] HAVENS (L. C.) et MAYFIELD (L. R.). *J. Inf. Dis.*, 1932 b, **51**, 511.
- [8] HAVENS (L. C.) et MAYFIELD (L. R.). *J. Inf. Dis.*, 1933, **52**, 364.
- [9] MANSI (W.). *J. Comp. Path.*, 1957, **67**, 297.
- [10] VILLEMOT (J.-M.) et PROVOST (A.). *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays. trop.*, 1958, **11**, 387.
- [11] KORNGOLD (L.) et VAN LEEUWEN (G.). *J. Immunol.*, 1957, **78**, 172.
- [12] CROWLE (A.). *J. Immunol.*, 1958, **81**, 194.
- [13] FULTON (F.) et DUMBELL (K. R.). *J. gen. Microbiol.*, 1949, **3**, 97.
- [14] REAGAN (R. L.), DAY (W. C.), HARMON (M. P.) et BRUECKER (A. L.). *Am. J. Vet. Res.*, 1953, **14**, 111

- [15] VAN DEN ENDE (M.), POLSON (A.) et TURNER (G. S.). *J. Hyg.*, 1957, **55**, 361.
 - [16] THOMPSON (S.). *Am. J. Vet. Res.*, 1957, **18**, 886.
 - [17] THOMPSON (S.). *Am. J. Vet. Res.*, 1957, **18**, 895.
 - [18] Cité par KIPPS et coll. [4].
 - [19] HOYLE (L.). *J. Hyg.*, 1952, **50**, 229.
 - [20] HOYLE (L.). *J. Path. Bact.*, 1952, **64**, 419.
 - [21] HOYLE (L.), REED (R.) et ASTBURY (W. T.). *Nature*, 1953, **171**, 256.
 - [22] UEKI (H.), KATO (T.), OISHI (J.), MURAKAMI (H.) et SHIMADA (K.).
Am. J. Vet. Res., 1957, **18**, 216.
-

FLUORESCENCE ET ACIDO-ALCOOLO-RÉSISTANCE RELATIVE DU BACILLE TUBERCULEUX

par J. DEGOMMIER (*).

(*Institut Pasteur, Laboratoires de Recherches sur la Tuberculose*
[Chef de Service : J. BRETEY])

A la suite de la mise au point d'une technique de double coloration pour la recherche en fluorescence du bacille tuberculeux [4], nous avons fait, au Laboratoire de Praz-Coutant (Haute-Savoie), une étude comparée de cette nouvelle technique avec la technique classique de Ziehl-Neelsen [5, 6].

Cette étude avait fait apparaître que la fluorescence révélait, sur un certain nombre de produits pathologiques, des bacilles que l'on ne retrouvait pas au Ziehl.

Rappelons brièvement les chiffres :

Nombre de frottis examinés en fluorescence	1 209
1 011 négatifs.	
198 positifs.	

Sur chaque lame positive, trois ou quatre champs contenant des bacilles fluorescents avaient été repérés par un cerclage au diamant. Après recoloration au Ziehl, les champs repérés avaient été examinés en lumière blanche. Les résultats avaient été les suivants :

	NOMBRE DE LAMES
Bacilles retrouvés et confirmés dans leur identité ...	144
Quelques bacilles retrouvés	34
Retrouvés mais non conformes aux normes	5
Aucun bacille retrouvé	15

En résumé, nous avons trouvé un excédent de bacilles fluorescents et, de plus, 15 lames ne comportaient que des bacilles fluorescents non retrouvés au Ziehl.

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 5 février 1959.

En terminant cette étude nous avons donc dit que ce surplus de bacilles posait un problème et que nous nous proposons d'en rechercher la solution.

C'est à la variation de l'acido-alcool-résistance du bacille de Koch qu'en définitive nous nous sommes arrêté pour formuler une explication.

Depuis la découverte de l'acido-alcool-résistance du bacille tuberculeux, par Ehrlich en 1882 [9], un très grand nombre de chercheurs ont étudié cette propriété des Mycobactériacées [1, 2, 3, 7, 10, 11, 12, 13, 17, 18].

Pour les besoins de notre exposé, nous retiendrons seulement que tous les auteurs sont d'accord pour admettre que l'AAR du bacille de Koch varie d'intensité en fonction de différentes causes, notamment de son âge.

Au cours du présent travail nous nous sommes borné à démontrer que la fluorescence induite par l'auramine permet de révéler un surplus de bacilles de Koch de moindre AAR que ceux révélés par le Ziehl-Neelsen.

Pour y parvenir nous avons utilisé la technique des *Colorations superposées*.

TECHNIQUE DE COLORATION.

Un frottis déjà coloré par l'auramine et examiné en fluorescence peut, sans inconvénient, être recoloré par le Ziehl et examiné en lumière blanche (technique de J. Augier). Mais, après cette deuxième coloration, il devient impossible de le revoir en fluorescence.

Pour avoir deux colorations superposées, il faut :

1° Colorer par la fuchsine de Ziehl à chaud dix minutes.

Décolorer par l'acide sulfurique au quart deux minutes et par l'alcool à 90° cinq minutes.

Rincer à l'eau.

2° Colorer par l'auramine 1 p. 1 000 à froid quinze minutes.

Décolorer par l'alcool acide 5 p. 1 000 cinq minutes.

Rincer à l'eau.

Sécher à l'air.

On peut alors, la lame étant placée sous le microscope, passer instantanément de l'examen en lumière blanche à l'examen en fluorescence. Toutefois précisons bien que cette nouvelle technique ne présente qu'un intérêt d'étude. Pour le diagnostic courant, elle ne se justifierait en aucune façon.

APPAREILLAGE OPTIQUE.

Nous utilisons le microscope Dialux binoculaire de Leitz, objectifs à la fluorine, corrigés pour emploi sans lamelles, oculaires périplans. Pour la fluorescence il suffit de poser un filtre bleu (Wild) sur l'orifice de sortie de l'éclairage incorporé. Il peut donc être enlevé et remis instantanément. Chaque objectif contient dans sa partie supérieure un

filtre jaune constitué d'un petit disque découpé dans un filtre Wratten Kodak n° 12 gélatine libre. Ces filtres jaunes restent en place, même pour le travail en lumière blanche.

OBSERVATIONS.

Les observations ont été faites sur :

- 1° Des cultures pures âgées de 2 à 66 jours ;
- 2° Des cultures pures très âgées ;
- 3° Des cultures de produits pathologiques.

1° Cultures pures à différents âges.

Prenons, par exemple, une lame supportant un étalement de H37Rv cultivé en milieu de Dubos, âgé de 17 jours. Appliquons-lui, après séchage et fixation par l'alcool méthylique, les colorations superposées indiquées plus haut.

Examinée en lumière blanche (objectif $\times 95$, oculaire $\times 6$, coefficient du tube binoculaire $\times 1,25$, soit un grossissement total de 712,50), cette lame présente l'aspect bien connu d'une préparation colorée au Ziehl, sans bleu de méthylène. Choisissons un champ contenant quelques petites colonies en amas et également des bacilles isolés. Puis examinons ce même champ en fluorescence. Il suffit pour cela de placer le filtre bleu et de pousser l'intensité lumineuse grâce au rhéostat. Nous remarquons immédiatement :

- 1° Quelques bacilles isolés très fluorescents ;
- 2° Au sein des colonies en amas, des bacilles très fluorescents.

C'est ce qui saute aux yeux, mais au fur et à mesure que la vue s'accommode, on peut voir des bacilles plus ou moins fluorescents. On voit également très bien les amas en rouge, car la fuchsine est fluorescente dans cette couleur. Cependant cette fluorescence est beaucoup trop faible pour qu'un bacille isolé, coloré au Ziehl, puisse se distinguer, même très faiblement. Ce n'est que par un effet de masse que la fuchsine peut se manifester en fluorescence (1).

Repérons visuellement un bacille isolé très brillant et retirons avec précaution le filtre bleu, en le faisant glisser progressivement sur le côté. Il arrive un moment où la fluorescence disparaît et où l'on voit en lumière blanche (si l'on retire entièrement le filtre, on est brutalement aveuglé). On constate alors que le bacille très brillant est invisible en lumière blanche. Par contre, on peut voir aux alentours un certain nombre de bacilles bien rouges en lumière blanche et complètement invisibles en fluorescence.

(1) En photographie, grâce au temps de pose très long imposé par la fluorescence, ces bacilles arrivent à impressionner l'émulsion.

Quant aux bacilles présentant une fluorescence plus ou moins atténuée, on peut aisément constater, avec un peu de patience, qu'on les retrouve en lumière blanche. Ils sont plus ou moins colorés par la fuchsine : plus un bacille est coloré par la fuchsine, moins il est visible en fluorescence, et inversement car la fuchsine voile la fluorescence de l'auramine.

Il est facile de s'expliquer ce qui se passe.

Au moment de la décoloration par l'acide sulfurique au quart et par l'alcool, le plus grand nombre des bacilles retiennent énergiquement la fuchsine, d'autres la retiennent moins, d'autres enfin ne la retiennent pas du tout.

On recolore par l'auramine, qui, elle, résiste davantage à l'action de la décoloration qu'on lui fait subir. Les bacilles qui n'avaient pas retenu la fuchsine sont très fluorescents, ceux qui l'avaient retenue énergiquement ne sont pas du tout fluorescents. Entre les extrêmes il y a place pour tout un dégradé, correspondant à la plus ou moins grande acido-alcool-résistance relative de chaque bacille.

Cette assertion se trouve contrôlée par le fait que, grâce à une nouvelle coloration à la fuchsine suivie d'un simple rinçage rapide à l'alcool, on retrouve tous les bacilles vus précédemment. Il y en a même d'autres en plus. Ce sont ceux qui n'avaient pas résisté à la décoloration alcool-acide appliquée après la coloration par l'auramine et qui sont par conséquent encore moins acido-résistants. Rappelons qu'il s'agit d'une culture pure de H37Rv et que tous ces bacilles sont d'authentiques bacilles de Koch.

Ce qui précède est illustré par les figures 1 et 2.

Si l'on refait la même expérience en partant d'une culture de H37Rv en milieu de Youmans, les constatations sont comparables aux précédentes sous un aspect quelque peu différent, puisque les colonies se présentent en forme de cordes. En fluorescence, on voit alors au sein de ces cordes des bacilles très brillants, d'autres moins brillants, qui tous contrastent fortement avec l'ensemble de la colonie rouge fluorescente beaucoup plus terne.

La proportion de ces bacilles brillants est extrêmement variable. Certaines colonies n'en comportent aucun, alors que d'autres colonies sont presque entièrement formées par eux avec quelques rares bacilles rouges que l'on ne peut discerner qu'en lumière blanche, et cela pour un même étalement. Toutefois, ces deux extrêmes sont assez rares et en général presque toutes les colonies comportent une grande proportion de bacilles ayant retenu la fuchsine (fig. 3).

L'exposé ci-dessus est le résumé schématique des nombreuses observations que nous avons faites dans les conditions suivantes :

Nous avons pris deux souches bien connues et bien définies :

a) H37Rv ;

b) HAM-C-12 (cette souche a été isolée à l'Institut Pasteur :

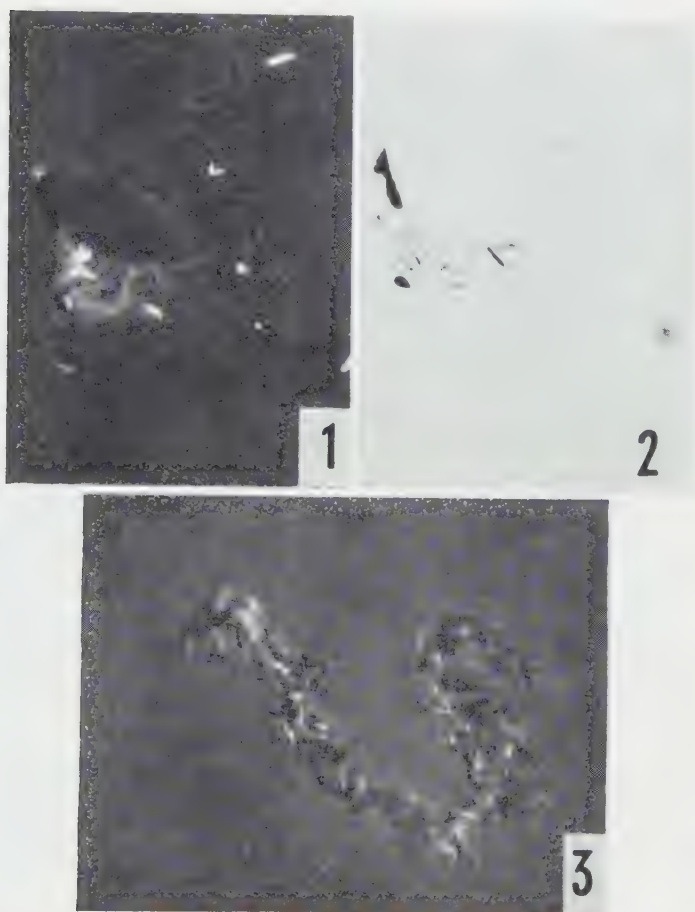


FIG. 1 et 2. — H37Rv cultivé en Dubos âgé de 17 jours. Le même champ vu en fluorescence figure 1 et en lumière blanche figure 2.

FIG. 3. — H37Rv cultivé en Youmans âgé de 17 jours. Sur cette figure on distingue en noir les bacilles qui ont retenu la fuchsine et en blanc les bacilles supplémentaires révélés par la fluorescence.

elle est entretenue sur Löwenstein-Jensen et a subi 12 passages sur cobayes).

Chacune de ces souches a étéensemencée en milieu de Dubos

d'une part, et en milieu de Youmans d'autre part, soit quatre catégories :

H37Rv Dubos,
H37Rv Youmans,
HAM-C-12 Dubos,
HAM-C-12 Youmans.

Des prélèvements de culture ont été étalés aux âges suivants, en jours : 3, 5, 7, 10, 12, 14, 17, 19, 26, 32, 46, 66. Quatre lames pour chaque catégorie, à chaque âge, soit en tout $4 \times 4 \times 12 = 192$ lames.

Toutes ces lames ont été traitées par la technique des colorations superposées et nous avons étudié sur chacune d'elles environ 10 champs, soit au total près de 2 000 champs.

Nous avons ainsi pu constater :

- 1° Aucune différence entre les deux souches ;
- 2° Entre les deux milieux, simple différence d'aspect sans différence fondamentale ;
- 3° L'âge des cultures ne détermine pas d'écarts apparents dans la proportion des bacilles fluorescents sur l'ensemble des étalements, mais nous répétons qu'il y a de grands écarts d'une colonie à l'autre dans un même étalement (fig. 4 et 5).

2° Cultures pures très âgées.

Il s'agit de vieilles cultures maintenues en étuve à 37° depuis leur ensemencement.

Nous avons fait un certain nombre d'étalements traités en colorations superposées.

1° H37Rv en Youmans, âgée de 9 mois. Nous avons pu constater que les colonies vues en lumière blanche montrent des bacilles rouges très clairsemés, inclus dans une substance haylomorphe, figurant assez souvent, dans son ensemble, l'aspect caractéristique d'une colonie en cordes. Cette substance en lumière bleue est fluorescente sans éclat. On n'y distingue aucun bacille individualisé. Nous pensons qu'elle est constituée de bacilles lysés. Nous avons fait des lames Ziehl-bleu de méthylène. Cette substance est fortement cyanophile (fig. 6 et 7).

2° H37Rv en Dubos, âgée de 8 mois. Mêmes constatations que ci-dessus.

3° Cultures de produits pathologiques.

Il s'agissait jusqu'ici de souches isolées et entretenues en cultures pures depuis de longues années, souches indemnes de toute attaque par les antibiotiques.

Nous avons refait ces mêmes expériences avec des cultures en Dubos et en Youmans de produits pathologiques précédemment identifiés en Jensen (onze produits de différentes origines)

Nos observations ont été comparables aux précédentes.

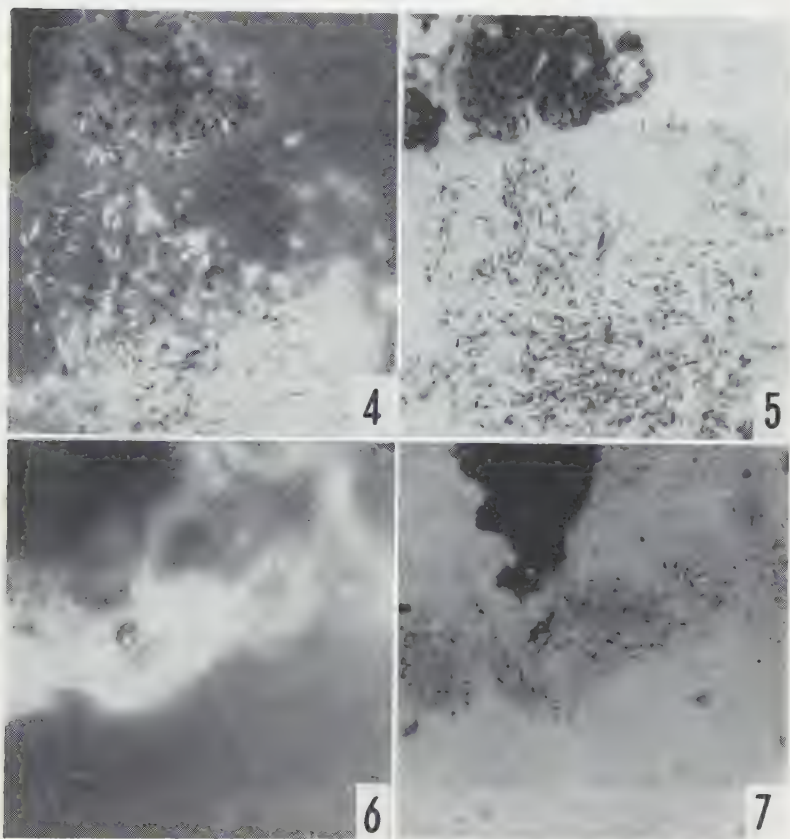


FIG. 4 et 5. — H37Rv en Youmans âgé de 26 jours. Figure 4, en fluorescence ; figure 5, en lumière blanche. On remarque dans ce même champ, deux colonies voisines ayant retenu différemment la fuchsine.

FIG. 6 et 7. — H37Rv, vieille culture en Youmans âgée de 9 mois. Figure 6, en fluorescence ; figure 7, en lumière blanche.

Il nous faut cependant mentionner à part le cas suivant :

Une homoculture (technique de F. Tison [46]) a été faite à partir d'une pièce d'exérèse par râclage de paroi cavitare. Un étaie-

ment a été fait après quinze jours d'étuve à 37° (2). Après colorations superposées nous avons pu constater que les colonies s'étaient abondamment développées en longues cordes minces très contournées. Les parties fluorescentes sont très étendues et il semble que cette culture renferme une très grande proportion de bacilles faiblement AAR (voir fig. 8 et 9). Il s'agit d'une culture particulièrement florissante, mais sans doute n'est-il pas inutile de signaler que le malade opéré avait été traité antérieu-

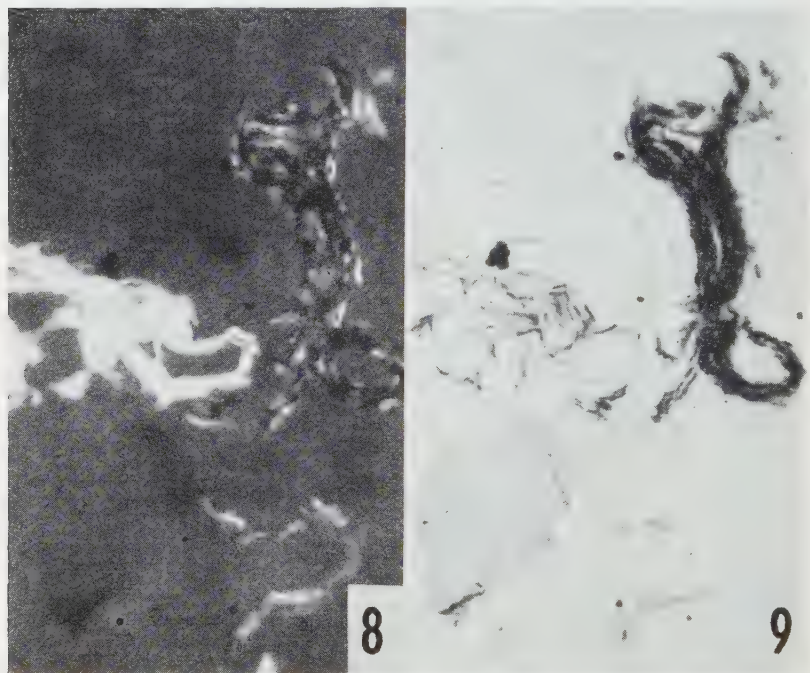


FIG. 8 et 9. — Homoculture d'un râclage de paroi cavitaire sur une pièce d'exérèse (âge : 15 jours). Figure 8, vue en fluorescence ; figure 9, en lumière blanche.

rement et jusqu'au moment de l'intervention par de nombreux antibiotiques, notamment isoniazide et thioamide. La perte d'acido-résistance subie par le bacille tuberculeux lorsqu'il se multiplie en présence d'isoniazide et de thioamide a été décrite par différents auteurs [8, 14, 15].

(2) Nous remercions le Dr Boyé, Chef du Laboratoire central de Praz-Coutant, d'avoir bien voulu nous remettre cet étalement.

Nous nous proposons d'étudier cette question en fluorescence, mais nous croyons devoir préciser ici que cette perte d'AAR vient s'ajouter au manque d'AAR naturelle du bacille de Koch à un certain stade de son développement.

DISCUSSION.

De l'ensemble des observations que nous avons décrites et qui toutes se rapportent à des cultures, nous dégageons le fait suivant :

Qu'il s'agisse de souches pures sélectionnées ou de bacilles (déjà identifiés) en provenance de produits pathologiques divers, on trouve toujours, lorsque les cultures sont dans de bonnes conditions de végétation, des bacilles de trop faible AAR pour retenir le Ziehl, mais qui sont révélés par la fluorescence.

L'âge des bacilles est-il en cause ?

Les expressions « bacilles jeunes, adultes, vieux » sont des expressions commodes. Toutefois, elles ne rendent qu'un compte assez inexact de la réalité, si l'on admet que la multiplication se fait uniquement par scissiparité. On parle de cellule-mère et de cellules-filles, mais la première ne peut coexister avec les deux autres, puisque les cellules-filles sont constituées de la substance même de la mère répartie *en totalité* entre elles deux.

Néanmoins, on pourrait dire que les cellules sont jeunes lorsque la scission vient d'avoir lieu. Elles sont alors de faibles AAR et cet état se prolonge jusqu'au moment où leur métabolisme ayant transformé leur structure interne, elles deviennent AAR-Ziehl+, et se rapprochent de l'instant de leur division. La multiplication se poursuit. Chaque échelon ne dure normalement que quelques heures, comme l'ont observé et photographié Bretey et Browaeys chez *M. phlei* [19].

L'âge moyen des cellules au sein d'une culture semble donc lié étroitement à la vitesse de multiplication. Si la multiplication est très active, très rapide, il y a infiniment plus de jeunes que d'adultes. Si elle se ralentit, c'est-à-dire si la cellule ne se divise pas dès qu'elle est adulte, la population considérée, ou la colonie considérée, renferme une grande proportion de cellules adultes AAR-Ziehl+. La colonie est alors composée presque uniquement de bacilles rouges.

Quant aux vieux bacilles ils ne peuvent exister au sein d'une population en pleine activité de multiplication. Ils ne commencent à apparaître que lorsque les conditions de milieu ne sont plus favorables à la multiplication. C'est le cas, par exemple, des cultures très âgées où les bacilles ne trouvant plus dans le milieu les éléments nécessaires à leur vie normale vieillissent, meurent et se désagrègent.

CONCLUSION.

En biologie, il n'est pas de lignes de délimitation nette. Aussi ne saurait-on considérer la coloration de Ziehl-Neelsen comme un test rigide, délimitant strictement « acido-alcool-résistants » et « non-acido-alcool-résistants ».

A y regarder de près, on se rend compte que, dans un même étalement d'authentiques bacilles de Koch, H37Rv par exemple, coloré au Ziehl, une majorité de bacilles sont franchement rouges, mais qu'un certain nombre d'autres ont diversement retenu la fuchsine. On remarque des bacilles qui sont à peine roses. C'est à partir de cette zone inférieure d'acido-résistance que la fluorescence par l'auramine permet d'aller plus loin, et fait apparaître des bacilles que le Ziehl ne révèle pas. Ce qui est regrettable, car ces bacilles de moindre AAR sont, selon toute vraisemblance, de jeunes bacilles.

Il n'est donc pas surprenant de rencontrer *dans un étalement de produit pathologique* des bacilles de moindre AAR que ceux révélés par le Ziehl. Après les constatations que nous venons de faire sur les cultures, le contraire nous paraîtrait anormal. Aussi pensons-nous pouvoir conclure en disant que la fluorescence apporte un gain important de sensibilité que l'on pourrait estimer, en reprenant nos chiffres du début, à 15 pour 198 positifs, soit environ 7 p. 100 (chez des malades en traitement sanatorial).

Ajoutons que, dans ces conditions, le contrôle par le Ziehl, que nous préconisons dans notre précédente étude, nous paraît maintenant superflu, sauf dans les cas douteux, et à condition que l'observateur soit parfaitement entraîné à la technique de la fluorescence.

SUMMARY

FLUORESCENCE AND RELATIVE ACID-ALCOHOL-FASTNESS
OF TUBERCLE BACILLI.

In biology there are no sharp limitations. That is why the Ziehl-Neelsen technique does not allow an absolute distinction between acid-alcohol-fast and not a.a.-fast bacilli.

Indeed, on one and the same smear of authentic t.b. (e.g. H37Rv), after Ziehl-Neelsen staining one may see a majority of red bacilli, and a certain number of less intensely coloured organisms, some of them hardly a pale pink. At this particular point fluorescence allows to distinguish bacilli undiscoverable by Ziehl-Neelsen. This is important, as such feebly a.a.-fast bacilli are most probably young organisms, the more so when we are examining a smear of pathological material.

Our results in 198 sanatorium patients show 7 p. 100 more positive smears under fluorescence, as compared with Ziehl-Neelsen staining.

A good technician may concentrate on fluorescence microscopy, leaving out Ziehl-Neelsen staining altogether.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BRETEY (J.) et BROWAEYS (J.). *C. R. Soc. Biol.*, 1944, **138**, 403.
- [2] BRETEY (J.) et BROWAEYS (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1944, **70**, 357.
- [3] CALDERATO (V.) et PESCE (G.). *Minerva med.*, 1955, **46**, 720.
- [4] DEGOMMIER (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 692.
- [5] AUDRIN (J.) et DEGOMMIER (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **93**, 413.
- [6] DEGOMMIER (J.). *Bull. méd. Cambo*, 1957, **76**, 24.
- [7] DESBORDES. *Diagnostic bactériologique des Mycobactéries*, Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1951.
- [8] DUNBAR (J. M.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **92**, 451.
- [9] EHRLICH. *Deut. med. Wschr.*, 1882, **8**, 451.
- [10] HAUDUROY (P.). *Bacilles tuberculeux et paratuberculeux*, Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1950.
- [11] NÈGRE (L.) et BRETEY (J.). *Les bacilles de Koch incomplètement évolués*, Masson et C^{ie}, édit., Paris, 1955.
- [12] NÈGRE (L.), BOQUET (A.) et VALTIS (J.). *C. R. Soc. Biol.*, 1928, **99**, 45.
- [13] NÈGRE (L.), BOQUET (A.) et VALTIS (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1930, **44**, 247.
- [14] RIST (N.) et GRUMBACH (F.). *Rev. Tub.*, 1952, **15**, 665.
- [15] RIST (N.), GRUMBACH (F.), CALS (S.) et RIEDEL (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1952, **82**, 757.
- [16] TISON (F.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 668.
- [17] UYEDA (S.). *Rev. Tub.*, 1955, **19**, 984.
- [18] UYEDA (S.). *Rev. Tub.*, 1957, **21**, 95.
- [19] BRETEY (J.) et BROWAEYS (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1945, **71**, 331.

ÉTUDE IMMUNOLOGIQUE DE CERTAINES PÉRISPLÉNITES EXPÉRIMENTALES CHEZ LE CHIEN

par M. SAINT-PAUL et J.-L. BONNET (*).

(Institut Pasteur [Service R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE],
Clinique Médicale Thérapeutique [Professeur A. LEMAIRE],
Hôpital Saint-Antoine, Paris
et Centre de Chirurgie Expérimentale des Hôpitaux de Paris
[D^r A. DUFOUR et Professeur agrégé E. HOUSSET])

INTRODUCTION.

La rate joue un rôle capital dans les processus immunitaires : organe de séquestration et de destruction cellulaire, elle intervient dans la formation et la libération des antigènes ; organe producteur et, peut-être, réservoir d'anticorps, elle répond aux stimuli antigéniques. La part qui lui revient au cours des syndromes immuno-hématologiques avec auto-anticorps, chez l'homme, est maintenant bien connue [2]. Par contre, les expériences faites sur l'animal ne concernent, pour la plupart, que la production d'hétéro- et d'iso-anticorps [11, 39] et celles qui portent sur des auto-anticorps sont très peu nombreuses, par suite de difficultés techniques.

Au cours d'études sur l'hypertension portale dans les cirrhoses, faites sous la direction du professeur Lemaire en vue de tenter d'apprécier le rôle d'un facteur de surcharge splénique associé à l'hypertension par bloc intra-hépatique, nous avons été amenés à réaliser, chez le chien, des lésions spléniques qui pourraient être considérées comme susceptibles de provoquer une auto-immunisation. Nous avons, en effet, créé une pérисplénite par enrobage de la rate par de la méthylcellulose, ce qui provoque des lésions lentes et progressives de compression et de destruction du parenchyme splénique et aussi, probablement, d'une partie des cellules qui y sont séquestrées. Une note préliminaire [18] a indiqué les premières constatations anatomo-cliniques et biologiques dont l'ensemble fait l'objet de la thèse de l'un de nous (J.-L. Bonnet [3]).

(*) Manuscrit reçu le 18 février 1959.

Nous avons pensé qu'il était intéressant de faire l'étude immunologique de cette périsplénite et de rechercher si les lésions spléniques pouvaient être le *primum movens* d'un processus auto-immunitaire.

Des nécessités techniques, en grande partie inévitables, nous ont imposé, pour chaque animal, des restrictions dans le nombre et la quantité des prélèvements sanguins et un choix dans le type de réactions à effectuer. Nous l'avons fait en gardant pour objectif la recherche d'une auto-immunisation. C'est ainsi que nous n'avons pas recherché, malgré son intérêt, la présence de l'éventuel « syndrome hématologique macromoléculaire » que donne la méthylcellulose par injection intraveineuse au chien [19] ou intrapéritonéale au rat [15, 27].

Nous n'avons pas, non plus, pratiqué certaines réactions immunologiques que nous jugions de moindre intérêt que celles que nous avons choisies, étant donné les quantités de sérum relativement faibles dont nous disposions. Nous avons aussi dû éliminer, parmi les réactions qui, comme nous l'avons montré dans de précédentes publications, présentent un intérêt dans l'étude immunologique expérimentale du chien : des réactions d'iso-agglutination et d'hémolyse érythrocytaire [33], de recherche d'anticorps anti-leucocytaires [32] et anti-thrombocytaires [35] et d'anaphylaxie passive locale de type Prausnitz-Küstner [24]. Nous en avons éliminé d'autres dont diverses publications avaient montré la négativité ou la grande difficulté d'interprétation : fixation du complément, consommation de l'anti-globuline, etc.

Pour faciliter la compréhension d'ensemble de ce travail, nous mentionnons également ici, brièvement, les résultats anatomiques et manométriques.

Nous avons voulu, au cours de cette expérimentation, non seulement nous assurer de la positivité plus ou moins passagère de l'une ou l'autre de ces réactions immunitaires, mais surtout essayer de surprendre le déclenchement d'un de ces processus lents, chroniques et inexorables que Fiessinger [12], l'un des premiers, a décrits pour le foie et qui sont, croit-on, causés par une auto-immunisation.

MATÉRIEL ET TECHNIQUE D'ÉTUDE.

Nos recherches ont porté sur 16 chiens neufs, sauf un qui avait subi, un an auparavant, un enrobage de son pancréas suivant la technique utilisée ici pour la rate.

TECHNIQUE OPÉRATOIRE. Les chiens ont été opérés aseptiquement sous anesthésie avec prémédication (chlorpromazine). Avant fermeture de la paroi, de la pénicilline a été pulvérisée. Aucun traitement post-opératoire n'a été administré. La rate, une fois extériorisée, a été

soumise, lors de la première intervention, à plusieurs pulvérisations de méthylcellulose (« Nobécutane », Laboratoires Bofors, Suède), en veillant à ce que l'enrobage splénique soit total et strictement limité à la surface splénique, sans déborder sur les mésentères. L'organe a été réintégré après séchage de la matière plastique.

A chaque intervention ont été pratiqués les examens suivants : biopsies hépatique et splénique, mesure de pression dans une collatérale porte, prélèvements sanguins dans la veine splénique et dans une artère périphérique pour oxymétrie. Des prélèvements de sang non hépariné ont été faits dans une seringue spéciale pour les recherches immunologiques.

Les recherches immunologiques que nous avons pratiquées sont les suivantes :

1° Recherche de l'auto- et de l'iso-agglutination à 4°, 20° et 37°.

2° et 3° Réactions de Coombs directe et indirecte.

4° Recherche des anticorps vis-à-vis d'hématies traitées par un enzyme protéolytique (papaïne).

5° Réaction de précipitation antigène-anticorps interfaciale en milieu liquide (réaction du disque). De plus, pour les sérums de la première série d'animaux, réaction en milieu gélifié suivant la technique d'Ouchterlony.

6° Recherches des agglutinines vis-à-vis d'hématies de mouton tannées, traitées ou non traitées par des extraits de rate de chien.

Toutes les techniques que nous avons employées étant bien connues et codifiées, nous ne signalerons que quelques points particuliers.

1° *Réaction d'auto-agglutination*. — Elles ont été pratiquées en eau physiologique, respectivement à 4°, 20° et 37° C. En général, on a utilisé, pour la réaction à 20°, les érythrocytes lavés du chien lui-même ; pour les réactions à 4° et à 37°, des érythrocytes lavés provenant de chiens sélectionnés, dont les globules rouges n'étaient pas porteurs des antigènes de groupes sanguins les plus fréquents chez cet animal. Cette remarque est valable pour les autres réactions où ont été employés les isoglobules de chien. On a opéré par titrage en progression géométrique du sérum pur, jusqu'au sérum dilué à 1/4 000. Des réactions indirectes de Coombs ont été faites sur les tubes négatifs.

2° et 3° *Réactions directe et indirecte de Coombs*. — La réaction directe a été effectuée sur lame, à plusieurs concentrations érythrocytaires. Les globules rouges ont été lavés quatre fois. La réaction indirecte a été effectuée en tubes, par titrage, et lue directement, au miroir concave, après une heure à 37°, et aussi après centrifugation.

Le sérum de Coombs était du sérum de chèvre anti-sérum de chien, très soigneusement absorbé avec les érythrocytes de plusieurs chiens (en particulier de celui dont on utilisait les globules pour la réaction), et dont l'action avait été vérifiée sur des sérums témoins positifs.

4° *Recherche d'anticorps anti-hématies papainées*. — A des dilutions de sérum dans l'eau physiologique (de 1/1 à 1/4 000), on a ajouté une goutte d'érythrocytes papainés à 10 p. 100. La lecture a été effectuée au miroir concave, après deux heures d'étuve à 37°.

5° *Réactions de précipitation antigène-anticorps*. — a) En milieu liquide : la réaction a été faite en superposant, dans de petits tubes

de verre, le sérum à étudier et des extraits de rate de chien. Pour la première série d'expériences, les extraits étaient dilués à 1/40, dans l'eau physiologique, et la réaction a été faite en double, pour chaque sérum, avec des extraits de rate normale et des extraits de rate prélevée lors d'une réintervention. Pour la deuxième série, il n'a été utilisé que des extraits de rate d'animal normal, à la dilution de 1/100.

b) En milieu gélosé, la technique d'Ouchterlony n'a été utilisée que pour la première série d'expériences. Nous avons employé une gélose à 2 p. 100 dans de l'eau physiologique, coulée en boîtes de Petri et dans laquelle on avait découpé des godets avec un moule. Notre moule se compose de trois rangées de trois emporte-pièces arrondis de 1 cm de diamètre, situés à 1 cm les uns des autres. Dans ces godets, dont le fond a été obturé au préalable par une goutte de gélose en surfusion, ont été mis les sérums à examiner et des extraits semblables à ceux employés dans la réaction en milieu liquide, pour la première série. Les boîtes ont été soigneusement fermées et les godets remplis à deux jours d'intervalle. Les lectures des réactions ont été faites tous les jours pendant trois semaines.

6° *Réactions d'agglutination d'hématies tannées.* — Nous avons utilisé la technique de Boyden [5], en suivant, à la suite d'Antoine et Ducrot [4], les modifications apportées par Borduas et Grabar [4] et Stavitzky [40]. Les hématies de mouton ont servi pour la réaction, ainsi que pour l'absorption des sérums à examiner et du sérum de lapin utilisé dans le milieu de dilution. Le milieu de dilution des sérums et des hématies était du sérum de lapin dilué respectivement à 1/50 et à 1/250. L'acide tannique était précipité à l'alcool (Rhône-Poulenc). L'antigène était un extrait de rate de chien normal, dilué à 1/20. Les résultats de l'analyse immuno-chimique de cet extrait, pour une expérience, ont été les suivants : N : 0,10 mg/cm³ ; protéines : 0,62 mg/cm³. A titre de contrôle, nous avons utilisé des sérums de chien normaux, dont certains contenaient des iso-anticorps naturels anti-érythrocytes de chien, des sérums de lapin normal et de lapin anti-foie humain, des sérums de chèvre normale et de chèvre anti-sérum de chien. De tous ces sérums, seul celui de chèvre anti-sérum de chien nous a donné un résultat positif.

RÉSULTATS IMMUNOLOGIQUES.

Les résultats de nos expériences sont consignés dans les tableaux ci-joints. Ils sont classés par animal et par prélèvement. Pour chaque échantillon de sang, nous indiquons le nombre de semaines ou, dans quelques cas, de jours écoulés entre l'enrobage splénique par la matière plastique et le prélèvement du sang.

Nos expériences se partagent chronologiquement en deux séries. La première (1956-1957) comprend les animaux 85 (sauf les échantillons 7 et 8), 87, 90, 93 (sauf les échantillons 6 et 7), 94, 96, 97 (sauf l'échantillon 5), 105, 106 et 107. La seconde (1957-1958) comprend les animaux 84, 85 (échantillons 7 et 8 seulement),

93 (échantillons 6 et 7 seulement), 97 (échantillon 5 seulement), 125, 127, 129, 132 et 138.

Les différences entre ces séries ne touchent que les réactions antigène-anticorps, comme indiqué précédemment. Dans un but de simplification, les résultats des réactions de précipitation (entièrement négatifs) ne sont pas reportés sur le tableau.

Les résultats expérimentaux sont classés par type de réaction : réactions d'auto-agglutination à 4° (celles à 20° et 37°, constamment négatives, ne figurent pas sur notre tableau), réactions de Coombs directe et indirecte, recherche des anticorps anti-hématies papainées, réactions d'agglutination d'hématies tannées traitées ou non traitées par des extraits de rate de chien. Les chiffres indiquent des titres de positivité. Le signe + indique une positi-

TABLEAU I.

N° de l'animal	N° du prélèvement	Nombre de semaines depuis l'enrobement	Intervention	Auto-agglutination à 4° C°	Réaction de Coombs		Globules rouges papainés	Globules rouges tannés		Pression portale cm H ₂ O	Anatomie pathologique
					Directe	Indirecte		Avec	Sans antigène		
84		0	*	0	0	0	0	0	0	13,5	Quelques taches blanches superficielles. Atrophie modérée - 13 mois auparavant enrobement au nobécutine.
	2	2 jours		0	0	0	0	0	0		
	3	1		0	0	0	0	10	0		
	4	2		0	0	0	0	10	0		
	5	3		0	0	0	0	20	0		
	6	6		0	0	0	0	10	0		
	7	8		0	0	0	0	±	0		
	8	10		0	0	0	0	0	0		
	9	13		0	0	0	0	0	0		
	10	17	*	0	0	0	0	0	0	40	Périssplénite importante. Pulpe blanche riche. Congestion centrale.
85	11	22	*	0	0	0	0	0	0	16	Adhérences périsspléniques. Capsule épaissie. Parenchyme normal mais congestif.
	1	0	*			0	0			9	Normal
	2	4	*	0	0	0	0	0	0	42	Capsule non épaissie. Plaques blanchâtres superficielles. Congestion intense du parenchyme.
	3	16			0	0	0				
	4	22	*	0	0	0	0	0	0	5	Périssplénite constituée. Congestion très marquée.
	5	27		0	0	0	64	0	80		
	6	33	*	0	0	0	256	0	40	23	Périssplénite organisée vascularisée. Densification du parenchyme.
	7	51		0	0	0	0	10	0		
	8	71	*	0	0	0	0	10	0		Périssplénite très importante vascul. Parenchyme atrophie. Foyers d'autolyse et de nécrose avec macrophages.
87	1	0	*	0		0	0	0	0	8	Congestion parenchymateuse. Sclérose pulpaire irrégulière.
	2	4	*	0	0	0	0	0	0	29	Périssplénite très importante comprimant le tissu splénique.
90	1	0		0		0	0	0	0	8	Rate normale.
	2	10		0	0	0	0	20	0	8	Aspect microscopique et macroscopique normal. Echec de l'enrobement.

TABLEAU I (suite).

N° de l'animal	N° du prélèvement	Nombre de semaines depuis l'enrobement	Inter- vention	Auto- agglutination à 4° C*	Réaction de Coombs		Globules rouges papainés	Globules rouges tannés		Pression portale cm H ₂ O	Anatomie pathologique
					Directe	Indirecte		Avec	Sans antigène		
93	1	0	*	0	0	±	0	0	0	13	Capsule normale Légère congestion parenchymateuse
	2	11	*	0	0	±	0			23	Légère périsplénite Congestion modérée de la pulpe.
	3	17		0	0	±	0	0	0		
	4	22		0	0	±	0	0	0		
	5	28	*	0	0	±	0	0	0	32	Périsplénite très intense avec fibrose pulpaire
	6	46		0	0	±	0	0	0		
	7	63		0	0	±	0	0	0		
94	1	0	*	0	0	0	0	0	0	14	Pulpe riche Capsule normale
	2	1	*	0	0	0	64	0	0	23	Périsplénite irrégulière. Pulpe rouge, riche. Qq foyers de nécrose hémorragique
96	1	0	*			0	0			23	Capsule normale Fibrose pulpaire moyenne
	2	12	*	0	0	0	128	0	0	32	Pulpe plus active Sacrifié: gros abcès de la fesse
97	1	0	*	0	0	0	0	0	0	10	Capsule normale Congestion hémorragique sous-caps.
	2	3	*	0	+	0	0	0	0	25	Périsplénite légère. Congestion sous-caps. Tassement de la pulpe
	3	11		0	0	0	0	0	0		
	4	17	*	0	0	0	0	0	0	5	Périsplénite considérable avec adhérences. Splénectomie. Réaction lymphoïde pulpaire
	5	40	*	0	0	0	0	0	0	5	
105	1	0	*	0	0	0	0	0	0	8	Rate normale
	2	5		0	0	0	0	0	0		
	3	8	*	0	0	0	0	0	0	8	Périsplénite partielle. Augmentation de la richesse pulpaire
106	1	0	*	0	0	0	0	0	0	26	Rate normale. Foie normal. Hypertension portale essentielle
	2	3		0	0	0	0	0	0		
	3	9	*	0	0	0	256	0	0	15	Périsplénite très organisée. Pulpe normale
108	1	0	*	0	0	0	0	0	0	13	Capsule un peu épaisse. Pulpe normale. Foie normal
	2	2		0	0	0	0	0	0		
	3	8	*	2	0	0	512	0	0	5	Périsplénite très importante. Pulpe normale. Foie: métastases épithéliales.

tivité qualitative. Le signe $\pm$ indique une réaction faiblement positive.

En résumé, les résultats se présentent de la façon suivante :

1° *Réaction d'auto-agglutination.* — A 20° et 37°, nous n'avons jamais observé d'auto-agglutination. En ce qui concerne les agglutinines froides, nous avons, dans un cas (chien 108), constaté, huit semaines après l'intervention, une agglutinine froide de titre peu élevé (1/2).

TABLEAU I (suite et fin).

N° de l'animal	N° du prélèvement	Nombre de semaines depuis l'enrobement	Intervention	Auto-agglutin. à 4° C.	Réaction de Coombs		Globules rouges papainés	Globules rouges tannés		Pression portale cm H ₂ O	Anatomie pathologique
					Directe	Indirecte		Avec	Sans antigène		
25	1	0	*	0	0	0	0	0	0	17	Capsule normale. Parenchyme normal.
	2	4 jours		0	0	0	0	0	0		
	3	2		0	0	0	0	20	20		
	4	3		0	0	0	0	0	0		
	5	6		0	0	0	0	0	0		
	6	7	*	0	0	0	0	0	0	18,5	Capsule normale. Dilatation des sinus.
	7	8		0	0	0	0	0	0		
	8	12		0	0	0	0	0	0		
127	1	0	*	0	0	0	0	0	0	10,5	Capsule normale. Congestion sous-capsulaire.
	2	2		0	0	0	0	0	0		
	3	5		0	0	0	4	0	0		
	4	6		0	0	0	0	0	0		
	5	8	*	0	0	0	2	0	0	37	Léger épaissement de la capsule. Pulpe normale.
	6	11		0	0	8	0	0	0		
	7	5		0	0	0	0	0	0		
	8	21	*	0	0	0	0	0	0	14	Périspénite très intense. Parenchyme normal.
129	1	0	*	0	0	0	4	0	0	10	Rate normale
	2			0	0	0	4	0	0		
	3	9	*	0	0	8	4	0	0	15	Léger épaissement capsulaire. Pulpe normale.
132	1	0		0	0	8	4	0	0		
	2	0	*	0	0	0	2	0	0	14,5	Rate normale.
	3	1		0	0	0	0	0	0		
	4			0	0	0	0	0	0		
	5	2		0	0	8	0	0	0		
	6	2		0	0	0	0	0	0		
	7	3		0	0	0	0	0	0		
	8	4		0	0	0	0	0	0		
	9	8		0	0	0	0	0	0		
	10	10	*	0	0	0	2	0	0	28	Périspénite très intense. Congestion s-capsulaire. Pulpe normale. Maladie de Carré.
138	1	0	*	0	0	0	0	0	0	9,5	Rate normale
	2	6 jours		0	0	0	0	0	0		
	3	2		0	0	0	0	0	0		
	4	3		0	0	0	0	0	0		
	5	5	*	0	0	0	4	0	0	8	Périspénite localisée peu intense. Congestion s-capsulaire. Parenchyme appauvri.
	6	12	*	0	0	0	0	0	0	18	Périspénite importante. Pulpe rouge normale. Pulpe blanche active.

Done, dans l'ensemble, nos animaux n'ont pas développé d'*auto-agglutinines*. L'exception fournie par un animal a une valeur assez réduite, étant donné le taux faible de cette agglutinine.

2° *Réaction directe de Coombs*. — Elle est restée constamment négative, sauf pour un animal (chien 97), où elle était positive trois semaines après l'intervention. Elle a été négative lors des autres examens faits par la suite, le dernier ayant été pratiqué quarante semaines après l'enrobement splénique.

3° *Réaction indirecte de Coombs.* — Elle a été positive chez quatre animaux.

Chez le chien 93, elle a été faiblement et constamment positive, même avant l'intervention. Elle correspond à une agglutinine naturelle faible et rare, et difficilement absorbable par les érythrocytes d'autres chiens normaux.

Chez le chien 132, un fait paradoxal : elle était positive à 1/8 avant l'intervention, s'est négativée après, a de nouveau été observée à la dixième semaine. Sa présence avant et au moment de l'intervention semble probablement due à un état pathologique antérieur à l'enrobement splénique. Néanmoins, chez cet animal, pour le dernier prélèvement sérique, ainsi que pour deux autres chiens (n° 127 et n° 129), où elle a été observée respectivement onze et neuf semaines après l'enrobement, son titre était faible. Dans ces cas, on peut peut-être supposer l'apparition de substances nouvelles dans le sang.

4° *Recherche d'anticorps anti-hématies papainées.* — Au sujet des résultats de cette réaction, on peut faire deux constatations générales :

a) Sept chiens n'ont jamais présenté d'agglutinines de ce type. Ce sont les animaux 84, 87, 90, 93, 97, 105 et 125.

b) Elle a été positive chez neuf des seize animaux d'expérience atteignant, pour certains, des taux élevés (1/512). Dans six de ces cas (nos 94, 96, 106, 108, 127 et 138), la positivité est apparue quelques semaines après l'enrobement de la rate par la matière plastique. Dans un cas (n° 85), elle a été d'apparition plus tardive : elle peut être considérée comme traduisant la présence de substances sériques anormales dans le sang.

Pour les animaux 129 et 132, on doit probablement l'attribuer respectivement à un iso-anticorps naturel et à un état pathologique préexistant.

5° *Les réactions de précipitation antigène-anticorps* en milieu liquide et en milieu gélosé sont restées entièrement négatives. Ceci n'est guère étonnant, car elles nécessitent, l'une 3 à 5, l'autre 5 à 10 microgrammes d'azote-anticorps pour être positives, alors que la réaction d'hémagglutination simple n'a besoin que de 0,1 à 0,2 microgrammes (Grabar).

6° *Réactions d'agglutination d'hématies tannées.* — Les résultats des réactions d'agglutination des hématies de mouton tannées et sensibilisées ou non sensibilisées par des extraits de rate de chien peuvent se classer sous quatre rubriques :

a) *Réactions positives avec les hématies sensibilisées et négatives avec les hématies non sensibilisées.* — C'est le cas des ani-

maux 84, 85 et 90. Ces agglutinines ont été toujours de titre faible, atteignant au maximum 1/20.

Remarquons que, chez le chien 85, cette agglutinine, d'apparition tardive, a été précédée d'une agglutinine de type différent indiquée au paragraphe suivant.

b) *Réactions négatives avec les hématies sensibilisées et positives avec les hématies non sensibilisées.* — C'est le cas de l'animal 85, où cette positivité correspond à une positivité des réactions des hématies papainées. Pour cette réaction, d'aspect paradoxal, on peut émettre l'hypothèse que le tannage met en évidence, sur l'érythrocyte, des « sites antigéniques » sur lesquels se fixent des substances sériques normales ou anormales, comme Hœnig et Hœnigova [47] l'ont observé chez l'homme, dans différents états pathologiques. Les extraits spléniques, se fixant sur les érythrocytes tannés sans les agglutiner, entreraient en compétition avec les composants des sérums d'expérience, empêchant la fixation ultérieure de substances sériques agglutinantes. Ceci produirait une négativation paradoxale de la réaction.

c) *Réactions positives avec les hématies sensibilisées et les hématies non sensibilisées.* — Ce cas a été observé chez l'animal 125, deux semaines après l'enrobement, à des titres semblables et faibles (1/20).

d) *Réactions entièrement négatives.* — C'est le cas de la majorité des animaux : 87, 93, 94, 96, 97, 105, 106, 108, 127, 129, 132 et 138.

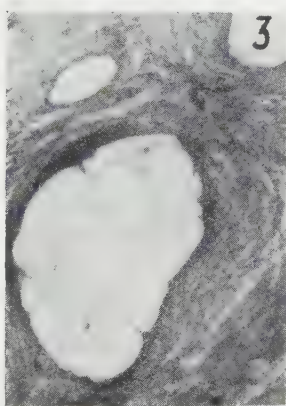
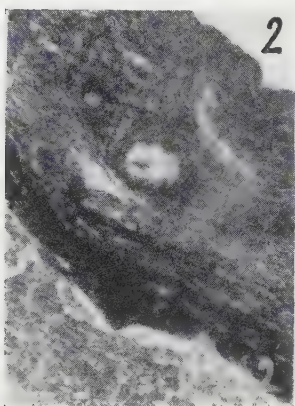
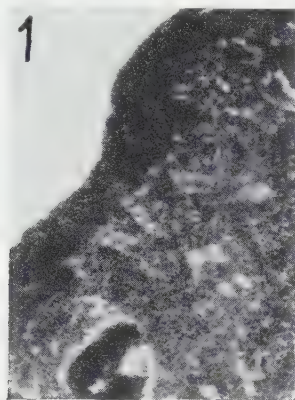
RÉSULTATS ANATOMIQUES.

Nous indiquons ici les constatations anatomiques d'ensemble. Pour chaque animal, les résultats sont rapportés brièvement sur les tableaux.

A l'examen macroscopique, au cours des deux premiers mois suivant l'enrobement, les lésions restent discrètes, mais manifestes. La rate est de *volume* sensiblement normal. Elle ne contracte que peu d'adhérences anormales. Le volume des veines spléniques est nettement augmenté. L'aspect de la *surface* splénique se modifie, prenant un aspect marbré, en raison de taches en piqueté de 2 à 3 mm de diamètre ou de plaques plus étendues et irrégulières de 1 cm de diamètre environ. Elles sont grisâtres et lisses et, quelquefois, on trouve, sur le même organe, les deux sortes de taches juxtaposées.

Dans certains cas, les lésions sont plus intenses et l'image est encore plus caractéristique : toute la surface splénique est devenue lisse, blanc grisâtre, avec de nombreuses et importantes adhérences. Il s'agit d'une périsplénite totale, accompagnée d'une augmentation importante de la pression portale.

En outre, dans trois cas (chiens 85, 97, 127), le dernier stade a été atteint et observé au bout de respectivement quatre, cinq



Mode évolutif des lésions spléniques à partir de l'enrobement par la méthylcellulose (chien 127).

FIG. 1. — *Avant l'enrobement.* Capsule splénique normale. Légère congestion sous-capsulaire.

FIG. 2. — *Huit semaines après l'enrobement.* PÉRISPLÉNITE importante : capsule très épaisse avec néo-vasseaux très volumineux.

FIG. 3. — *Vingt et une semaines après l'enrobement.* Photographie d'une zone de la capsule au même grossissement que la seconde photographie : pÉRISPLÉNITE considérable. Une formation pseudo-kystique très volumineuse, vide de globules rouges.

et dix-huit mois. La pÉRISPLÉNITE, considérable, s'accompagne d'adhérences fort importantes. La sclérose est très marquée et le parenchyme splénique réduit à une masse de 1 à 2 cm de

diamètre. A ce moment là, la pression portale est de nouveau normale.

On trouve, à l'*examen microscopique*, les images histologiques correspondantes. Dans un *premier stade*, vers le trentième jour après l'enrobement, la capsule est peu épaissie, les deux couches superficielle collagène et profonde musculaire lisse conservant leur structure. Elle est légèrement œdématiée, souvent parcourue par de petits néo-vaisseaux. Dans le parenchyme, il existe une dilatation congestive des sinus, avec fréquemment des dépôts de sang dans la région sous-capsulaire (fig. 1).

Les corpuscules de Malpighi sont élargis et les centres germinatifs sont plus actifs que dans la rate normale. Dans quelques cas, il existe une réaction réticulo-endothéliale.

Au *second stade*, les modifications capsulaires et parenchymateuses sont plus importantes. La rate est revêtue d'une coque épaisse et inextensible formée par la capsule très épaissie et vascularisée. La pulpe splénique, surtout dans la région sous-capsulaire, a un aspect tassé. Mais la congestion persiste parfois et il y a des foyers lymphatiques riches (fig. 2).

Enfin, au *troisième stade*, on constate que la capsule est énorme, uniquement fibreuse, avasculaire, semée d'images cavitaires irrégulières, vides de tout élément cellulaire. La pulpe splénique est quantitativement réduite et qualitativement très pauvre, les centres germinatifs ayant pratiquement disparu. Mais, même à cette période, l'envahissement de la pulpe splénique par le tissu conjonctif reste discret et on ne peut parler de fibrose du parenchyme (fig. 3).

RÉSULTATS MANOMÉTRIQUES.

Ces résultats sont indiqués en centimètres d'eau.

Dans au minimum deux tiers des cas, l'enrobement splénique crée une hypertension portale notable, qui peut se manifester rapidement. Mais elle semble transitoire, tout en étant de durée très variable.

DISCUSSION.

Ce travail avait pour but de rechercher si on pouvait provoquer une auto-immunisation anti-splénique et anti-érythrocytaire par enrobement de la rate par la méthylcellulose. Nous n'avons donc pas cherché ici à retrouver le syndrome hématologique proprement dit que la méthylcellulose provoque si on l'injecte par voie intraveineuse [19] ou intrapéritonéale [26, 14]. Nous avons, par ailleurs, confirmé chez le rat, après un enrobement semblable de la rate, l'existence d'un tel syndrome anémique et leucopénique [3].

Signalons que, par injection intrapéritonéale de méthylcellulose, Giblett [15] n'a pas obtenu, chez le rat, de réaction directe de Coombs positive. Nous n'avons pas, non plus, recherché une éventuelle immunisation contre la méthylcellulose, qui fera l'objet d'une publication ultérieure. Nous discuterons donc les résultats que nous venons d'exposer dans l'hypothèse d'une auto-immunisation.

Notre matériel biologique nous a imposé un choix parmi les techniques immunologiques à pratiquer. Pour celles que nous avons utilisées, nous nous sommes placés dans certaines conditions qualitatives (milieu de dilution, etc.) et quantitatives (dilutions d'antigènes et de réactifs) qui auraient pu, en d'autres mains, être différentes. Certains points de notre discussion doivent donc être strictement considérés dans l'optique de nos conditions d'expérience. Néanmoins, certaines conclusions, comparées à celles d'autres auteurs, ont une portée plus générale.

Nous avons classé les animaux en deux groupes : ceux chez lesquels toutes les réactions immunologiques sont restées négatives et ceux chez lesquels on a obtenu des réactions sérologiques positives.

A. RÉACTIONS NÉGATIVES. — Trois animaux, les chiens 87, 93 et 105 doivent être considérés comme ayant donné des résultats négatifs.

L'animal 87 a été observé pendant un mois après l'intervention. Ses réactions immunologiques sont restées négatives, malgré la périsplénite.

L'animal 93 avait un anticorps normal naturel donnant une réaction indirecte de Coombs faiblement positive. Il a été observé pendant sept mois et, malgré le résultat positif anatomique de l'enrobement splénique, n'a pas développé de réactions pour lesquelles on puisse discuter la présence d'auto-anticorps.

Chez l'animal 105, qui a été observé huit semaines, les réactions sérologiques sont restées négatives et la pression portale n'a pas augmenté, malgré le développement d'une périsplénite partielle.

B. RÉACTIONS POSITIVES. — La grande majorité des animaux (13 chiens) ont présenté des réactions immunologiques pour lesquelles on peut discuter la possibilité d'une auto-immunisation, au cours de la période d'observation qui, pour certains d'entre eux, a duré soixante et onze semaines. Nous avons classés les chiens en trois sous-groupes suivant le type de réactions immunologiques prédominantes qui ont été constatées chez eux.

- 1° Réaction directe de Coombs,
- 2° Réaction d'agglutination des hématies papainées,
- 3° Réaction d'agglutination des hématies tannées.

1° *La réaction directe de Coombs* a été constatée une fois, et chez un seul animal (n° 97). Ce chien a été étudié pendant quarante semaines et, chez lui, toutes les réactions de tous les autres types sont restées négatives. La réaction directe de Coombs n'a été trouvée positive qu'à la troisième semaine, en même temps qu'une augmentation de la pression portale et des plaques de périsplénite. Elle était de nouveau négative ensuite, lors des prélèvements aux onzième et dix-septième semaines, malgré une périsplénite intense.

Cette réaction, qui a été longtemps considérée uniquement comme un témoin de la fixation d'anticorps anti-érythrocytaires non agglutinants sur les érythrocytes, est maintenant, de l'avis général, susceptible d'une interprétation plus large. Elle a, en effet, été observée, chez le chien, après transplantation rénale [26], splénique, puis rénale [39], ou injections de substances toxiques comme la phénylhydrazine [28], ou un hétéro-sérum hémolytique [37, 38]. Ceci est en accord avec les travaux fondamentaux de R. Dujarric de la Rivière, qui a montré, le premier, le grand pouvoir d'adsorption des érythrocytes.

La positivité de la réaction est, dans ces cas, explicable par divers mécanismes : les substances toxiques injectées dans l'organisme auraient une action sur les érythrocytes et les « activeraient », c'est-à-dire modifieraient leur surface ; ainsi, ils deviendraient antigéniques pour des anticorps normalement présents dans le sérum ou d'une autre origine ; ou bien elles permettraient à l'hématie, en la lésant, de fixer des protéines sériques normales qui réagiraient avec des auto-anticorps déjà présents ; ou bien, lors de certaines infections bactériennes, des antigènes bactériens se fixeraient sur les hématies, ce qui produirait une réaction d'hémagglutination passive.

Ici, la réaction semble témoigner surtout de la présence, dans le sang, de substances anormales, à la suite de l'intervention initiale d'enrobement splénique. Ces substances sont fixées sur les érythrocytes qui joueraient le rôle de transporteurs. Par la suite, la réaction est devenue négative, malgré la progression de la périsplénite.

2° Un deuxième sous-groupe est celui des neuf animaux chez lesquels la *réaction d'hémagglutination des hématies papainées a été positive*.

a) Chez quatre d'entre eux (nos 94, 96, 106, 138), elle a été l'*unique réaction positive*, atteignant, sauf chez l'animal 138, des titres significatifs. Chez les chiens 94, 96 et 106, la date d'apparition (douze, onze et neuf semaines après l'enrobement), les constatations anatomiques, jointes aux taux de l'agglutination, suggèrent la présence d'auto-anticorps. Nous n'avons malheureu-

sement pas, pour ces animaux, de données sur l'évolution possible du processus.

b) Chez le chien 108, l'agglutinine atteignait un titre de $1/512$ à la huitième semaine et s'accompagnait d'une faible *auto-agglutinine*. Les conclusions qu'on peut en tirer sont analogues.

c) Chez les animaux n^{os} 127, 129, 132, on a observé, de plus, à un moment ou l'autre de l'expérience, une *réaction indirecte de Coombs positive*.

a) Chez l'animal 127, le faible taux de positivité de la réaction d'agglutination des hématies papainées aux cinquième et huitième semaines lui ôte beaucoup de sa signification, ainsi qu'à la positivité isolée de la réaction indirecte de Coombs (onzième semaine).

β) Pour le chien 129, la réaction d'agglutination des hématies papainées, positive dès avant l'enrobement et constamment positive au même taux ($1/4$) ensuite, semble témoigner de l'existence d'un faible anticorps naturel. La réaction de Coombs indirecte, au taux de $1/8$ à la neuvième semaine, simultanément à une péri-splénite, signale peut-être la présence, à ce moment-là, de substances anormales dans le sang.

γ) Le chien 132 présentait probablement un état pathologique (maladie de Carré) préexistant à la première intervention, d'où, à ce moment-là, une positivité des deux réactions. Une semaine après l'enrobement splénique, toutes les réactions immunologiques étaient négatives. Malgré cela, on ne peut donner de signification décisive, dans le sens d'une auto-immunisation par enrobement splénique, à la réaction de Coombs indirecte qu'on a retrouvée isolée à la deuxième semaine, ni à la réaction d'agglutination des hématies papainées positive à un taux très faible à la dixième semaine.

d) Le chien n^o 85 représente un cas très intéressant, unique dans notre série, de présence simultanée d'agglutinines pour les hématies papainées et d'agglutinines pour les hématies tannées, en l'absence d'autres réactions sérologiques positives. Leur titre (respectivement $1/64$ et $1/80$, $1/256$ et $1/40$ aux vingt-septième et trente-troisième semaines) les rend significatives. Nous avons dit plus haut que la négativité paradoxale des réactions avec les hématies tannées, sensibilisées par un extrait splénique, pouvait s'expliquer par la saturation par l'extrait splénique, sur l'hématie, de sites antigéniques sur lesquels se fixe l'agglutinine. Ce sont ces constatations qui, chez cet animal, peuvent évoquer la présence d'auto-anticorps. La présence isolée et très postérieure (cinquante et unième et soixante et onzième semaines) d'agglutinines anti-hématies tannées sensibilisées par l'antigène, mais à un taux très faible ($1/10$), n'a pas de valeur significative.

3° Restent trois animaux (84, 90 et 125) chez lesquels *les seules réactions positives ont été celles avec les érythrocytes tannés*.

Chez les chiens 84 et 90, il s'agissait d'une agglutinine contre les globules rouges tannés sensibilisés avec l'extrait splénique, à l'exclusion des globules rouges tannés non sensibilisés. Chez le chien 84, l'agglutinine a été observée de la première à la huitième semaine après l'enrobage splénique, avec un maximum à la troisième semaine, mais à un taux faible. Toutes les réactions immunologiques faites sur des prélèvements des dixième, treizième, dix-septième et vingt-deuxième semaines ont été négatives. Un enrobage du pancréas chez cet animal, réalisé l'année précédente, n'a laissé aucune séquelle immunologique. Chez le chien 90, l'agglutinine avait le taux de 1/20 à la dixième semaine. L'observation n'a pu être prolongée.

Chez le chien 125, la réaction a été positive avec les globules rouges tannés non sensibilisés, deux semaines après l'enrobage splénique. La réaction était de nouveau négative au bout de trois semaines. Elle est restée constamment négative ensuite, jusqu'à la fin de la période d'observation (douze semaines).

On doit remarquer que, sur ces trois animaux, seul le chien 84 a présenté une périsplénite après l'enrobage, ce qui incite à considérer avec prudence les faibles résultats sérologiques correspondants.

En résumé, on peut classer les 13 chiens qui ont présenté des réactions sérologiques à propos desquelles on peut discuter l'hypothèse d'auto-anticorps, en trois groupes, suivant que les réactions immunologiques observées ont été précoces, plus tardives et très tardives.

1° Quatre chiens ont présenté des *réactions précoces*, au cours des premières semaines suivant l'enrobage de la rate. Ce sont les animaux 84, 97, 125 et 132. Sauf pour le chien 97, qui présente le seul cas de positivité de la réaction directe de Coombs, il s'agit d'une réaction indirecte de Coombs (132) et d'agglutination des hématies tannées (84 et 125), à des taux faibles. Comme, chez ces animaux, il n'a pas été observé, par la suite, de réactions sérologiques positives significatives malgré une observation prolongée pendant douze à quarante semaines, on peut penser que les réactions traduisent en grande partie le passage dans le sang, à la suite de la première intervention, de substances qui se sont éliminées. D'ailleurs, chez l'un d'entre eux (125), il n'a pas été observé de périsplénite.

2° Huit animaux ont présenté des *réactions plus tardives*, entre la cinquième et la douzième semaine après l'enrobage. Il s'agissait d'agglutinines contre les hématies papainées. Celles-ci étaient fortes chez les animaux 94, 96, 106 et 108 (avec une faible agglu-

tinine froide), faible chez les animaux 127 (avec une réaction indirecte de Coombs non simultanée) et 138. Dans un autre cas, il s'agissait d'une réaction indirecte de Coombs (129) accompagnée d'une faible agglutinine contre les hématies papainées, mais préexistant à l'intervention. Enfin, chez le chien 90, c'étaient des agglutinines contre les hématies tannées recouvertes ou non d'antigène splénique. Dans tous ces cas, sauf trois (90, 94 et 96), pour lesquels nous n'avons pu obtenir de prélèvements précoces, les réactions étaient négatives sur les prélèvements qui ont été faits au cours des premières semaines qui ont suivi l'intervention. Mais nous n'avons pas d'indications sur l'évolution ultérieure du processus immunologique, sauf dans un cas (127) où les réactions étaient de nouveau négatives aux quinzième et vingt et unième semaines.

Chez tous ces animaux, il a été observé une périsplénite, sauf chez les chiens 90 (échec de l'enrobement constaté à la dixième semaine), 96 (sacrifié à la douzième semaine, en raison d'un abcès de la fesse) et 125 (capsule normale et dilatation des sinus à la septième semaine).

3° Chez le chien 85, la positivité des réactions immunologiques a été encore plus tardive, précédée de la constitution d'une périsplénite observée dès la quatrième semaine et qui est devenue considérable par la suite. Il s'agit d'agglutinines contre les hématies papainées et les hématies tannées, aux vingt-septième et trente-troisième semaines après l'intervention, à des taux significatifs. Par contre, lors des examens aux cinquante et unième et soixante et onzième semaines, ces réactions sont de nouveau négatives. Malgré, à ce moment-là, une très faible agglutinine contre les hématies tannées sensibilisées par l'extrait splénique, le processus observé semble, là encore, ne s'être pas prolongé.

Les résultats des réactions immunologiques que nous avons pratiquées peuvent, par conséquent, traduire la présence, dans l'organisme de treize des seize animaux d'expérience, de substances anormales, dont certaines seraient des auto-anticorps anti-érythrocytaires et anti-tissulaires. L'étude comparative des résultats histologiques et sérologiques montre donc que, chez neuf de ces animaux (chiens 84, 85, 94, 97, 106, 108, 127, 132, 138) ces réactions immunologiques pourraient être consécutives à une auto-immunisation provoquée par la périsplénite.

Les auto-anticorps anti-érythrocytaires proprement dits seraient analogues à ceux de certaines anémies hémolytiques avec auto-anticorps de l'homme et du chien [23]. Les auto-anticorps anti-tissulaires seraient actifs contre les constituants cellulaires (cellules rouges, blanches et réticulaires, etc.) et tissulaires de la rate.

Le processus d'auto-immunisation pourrait avoir deux causes principales :

La première est l'action de la méthylcellulose sur les érythrocytes et d'autres cellules et tissus. Elle les modifierait ; ils deviendraient antigéniques et déclencheraient la production d'auto-anticorps.

La seconde est la destruction discrète du parenchyme splénique et des cellules sanguines qui y sont contenues, par la progression de la périsplénite. Les produits de destruction tissulaire, n'étant plus reconnus par les cellules formatrices d'anticorps comme faisant partie de l'organisme, seraient antigéniques. Les anticorps formés seraient actifs contre les constituants chimiques normaux correspondants.

On peut y objecter que la périsplénite, qui comprime la rate et la réduit finalement à un petit noyau, entraîne une diminution de son activité fonctionnelle de production d'anticorps. Mais il est bien démontré que la rate est loin d'être l'organe exclusif de production des anticorps. En outre, les premiers phénomènes sérologiques constatés l'ont été bien avant l'atrophie de l'organe.

Dans une précédente publication, nous avons, quelle que soit l'hypothèse pathologique que l'on admette pour l'origine des auto-antigènes en général, proposé de nommer les auto-anticorps *para-auto-anticorps* (du grec *para*, près de, presque), ce qui nous paraît être plus exact, car il est toujours très difficile de démontrer qu'ils sont la réponse immunitaire à un véritable auto-antigène.

Mis à part les cas où l'auto-antigénicité est nécessairement déclenchée et conditionnée par une substance exogène ou endogène ou des circonstances transitoires (infection virale ou bactérienne, brûlure, etc.), le processus d'auto-immunisation est prolongé et considéré comme auto-entretenu. C'est même ce caractère d'auto-entretien qui a fait penser que certaines affections chroniques, progressives et irréversibles, comme la cirrhose du foie et la glomérulo-néphrite, auraient pour cause une auto-immunisation. Ce caractère signale, en effet, la présence du « cercle vicieux » par lequel la réaction de l'auto-anticorps avec les cellules normales lèse ces dernières, dont les produits de désintégration deviennent, à leur tour, auto-antigéniques. Lorsque le mode évolutif d'un syndrome clinique ou expérimental fait soupçonner une auto-immunisation, la présence d'anticorps sériques devrait pouvoir être constatée de façon répétée et suivie (sinon continue). Dans notre expérimentation, les réactions sérologiques auto-immunitaires significatives n'ont pas été constatées régulièrement lors de la surveillance de chaque animal, compte tenu de certaines irrégularités dans les dates des prélèvements sanguins. Nous ne pouvons donc apporter d'arguments décisifs en faveur du développement progressif et suivi d'un processus auto-entretenu que la destruction lente du parenchyme splénique, que nous

avons réalisée, semblait susceptible de déclencher. Plusieurs hypothèses peuvent être évoquées à ce sujet. Par exemple, l'évolution du processus auto-entretenu « à bas bruit », les auto-anticorps n'ayant été diagnostiqués par nous que lors d'augmentations quantitatives passagères. En général, ils seraient restés, qualitativement et quantitativement, en dehors du champ d'exploration des méthodes de diagnostic employées par nous. L'utilisation de réactions immunologiques différentes et plus sensibles aurait pu permettre de montrer la continuité du processus.

Ou bien les auto-anticorps se seraient fixés, en grande partie, au fur et à mesure de leur production, sur les antigènes tissulaires normaux correspondants, en particulier spléniques, ce qui, malgré la diminution progressive du parenchyme sous l'influence de la périsplénite, suffirait à empêcher qu'une quantité décelable soit, en général, présente dans le sang circulant.

En conclusion, les réactions immunitaires constatées dans le sang de chien présentant une périsplénite par enrobage de la rate par de la méthylcellulose semblent traduire la présence de substances anormales et, parmi elles, de para-auto-anticorps. Néanmoins, il semble difficile actuellement de démontrer, grâce à elles, le déroulement du processus que traduisent ces réactions.

Des recherches ultérieures seront nécessaires pour préciser cette évolution dans les syndromes expérimentaux ou cliniques pour lesquels on évoque l'existence d'auto-anticorps.

RÉSUMÉ.

Les auteurs ont créé une périsplénite chez le chien par enrobage de la rate par de la méthylcellulose. Ils en ont fait l'étude immunologique en effectuant les réactions d'auto-agglutination des hématies, les réactions directe et indirecte de Coombs, les réactions d'agglutination des hématies papainées, d'hémagglutination passive sur les globules rouges tannés recouverts d'extrait splénique, et de précipitation avec un extrait splénique. A l'occasion de l'enrobage et de plusieurs réinterventions chirurgicales, des mesures de pression portale et des prélèvements histologiques de la rate ont été effectués. Les animaux ont été suivis, certains d'entre eux jusqu'à soixante et onze semaines. Sur les seize animaux de l'expérience, treize ont présenté des réactions immunitaires, et on peut les classer en trois groupes :

1° Les chiens dont les réactions positives ont été observées précocement, dans les premières semaines après l'enrobage (4 animaux).

2° Ceux dont les réactions ont été tardives, observées cinq à douze semaines après l'enrobage (8 animaux).

3° Enfin, un animal chez lequel les réactions positives ont été constatées beaucoup plus tardivement (vingt-septième semaine).

La comparaison de ces résultats avec ceux des prélèvements histologiques semble indiquer que, chez neuf de ces animaux, certaines des substances dont ces réactions immunitaires traduisent la présence pourraient être des para-auto-anticorps anti-érythrocytaires et anti-tissulaires. Il s'avère actuellement difficile de suivre, seulement grâce à ces réactions, l'évolution du processus correspondant.

SUMMARY

IMMUNOLOGICAL STUDY OF CERTAIN EXPERIMENTAL PERISPLENITIS IN DOGS.

Perisplenitis has been induced in dogs by coating the spleen with methylcellulose. The authors study the immunological response of the animals by means of erythrocytic auto-agglutination, Coombs' direct and indirect reactions, agglutination of papain-treated erythrocytes, passive agglutination of tanned erythrocytes coated with splenic extract, precipitation by a splenic extract. Measurement of portal pressure and histological study of the spleen have been carried out. The animals have been kept under observation for a long time, sometimes seventy-one weeks. Among the sixteen dogs in experimentation, thirteen showed immunological reactions; they can be divided into three groups:

1. Dogs showing positive reactions within the first weeks after coating (four animals).
2. Dogs showing delayed reactions: five to twelve weeks after coating (eight animals).
3. A dog whose reactions were very much delayed: twenty-seventh week.

These findings have been compared with the results of the histological study: it seems that in nine animals certain substances demonstrated by the immunological reactions might be anti-erythrocytic and anti-tissular para-auto-antibodies.

It is difficult to follow the pathological process exclusively by means of immunological reactions.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ANTOINE (B.) et DUCROT (H.). *Rev. fr. Et. clin. biol.*, 1957, 2, 81.
- [2] BERNARD (J.) et MATHÉ (G.). XXX^e Congr. Fr. Méd., 1955, Rapports, II, 41.
- [3] BONNET (J.-L.). *Thèse Méd.*, Paris, 1959.

- [4] BORDUAS (A. G.) et GRABAR (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 903.
- [5] BOYDEN (S. V.). *J. exp. Med.*, 1951, **93**, 107.
- [6] CAJANO (A.), ROSS (J. F.), FINCH (S. C.), MILLER (A.) et WEINSTEIN (L.). *V^e Congr. Int. Hémat.*, Paris, 1954.
- [7] DACIE (J. V.). *Congr. Intern. Transf. Sang.*, Boston, 1956.
- [8] DAUSSET (J.). *Immuno-hématologie biologique et clinique*, Edit. Méd. Flammarion, Paris, 1956.
- [9] DUJARRIC DE LA RIVIÈRE (R.). *Immunité par mécanisme physico-chimique*, Masson, édit., Paris, 1934.
- [10] DUJARRIC DE LA RIVIÈRE (R.) et KOSSOVITCH (N.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1933, **51**, 149.
- [11] EYQUEM (A.) et OUDOT (J.). *C. R. Acad. Sci.*, 1953, **237**, 275.
- [12] FIESSINGER (N.). *Thèse Méd.*, Paris, 1908.
- [13] FUDENBERG (H.), BARRY (I.) et DAMESBEK (W.). *Blood*, 1958, **13**, 201.
- [14] GERNEZ-RIEUX (Ch.), GOUDEMAND (M.) et SAMAILLE (J.). *XXX^e Congr. Fr. Méd.*, 1955, *Rapports*, II, 199.
- [15] GIBLETT (E. R.), MOTULSKY (A. G.), CASSERD (F.), HOUGHTON (B.) et FINCH (C. A.). *Blood*, 1956, **11**, 1118.
- [16] HABERMAN (S.). *Blood*, 1958, **13**, 688.
- [17] HOENIG (V.) et HOENIGOVA (J.). *Presse méd.*, 1956, **64**, 1639.
- [18] HOUSSET (E.), NATALI (J.), ETIENNE (J.-P.) et BONNET (J.-L.). *Sem. Hôp., Path. et Biol.*, 1957, 1133.
- [19] HUEPER (W. C.). *J. Pharmac. exp. Therap.*, 1940, **70**, 201, et *Arch. Path.*, 1942, **33**, 1 et 267.
- [20] JANDL (J. H.), JONES (A. R.) et CASTLE (W. B.). *J. clin. Invest.*, 1957, **36**, 1428.
- [21] JANDL (J. A.) et TOMLINSON (A. S.). *J. clin. Invest.*, 1958, **37**, 1202.
- [22] LEMAIRE (A.) et DEBRAY (J.). *XXX^e Congr. Fr. Méd.*, 1955, *Rapports*, II, 3.
- [23] MILLER (G.), FURTH (F. W.), SWISHER (S. N.) et YOUNG (L. E.). *Am. J. Dis. Child.*, 1957, **93**, 35.
- [24] MILLOT (P.), SAINT-PAUL (M.) et VERMA (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **94**, 598.
- [25] MUIRHEAD (E. E.), GROVES (M.) et BRYAN (S.). *J. clin. Invest.*, 1954, **33**, 1700.
- [26] MUIRHEAD (E. E.) et GROVES (M.). *Arch. Path.*, 1955, **59**, 223.
- [27] PALMER (J. G.), EICHWALD (E. J.), CARTWRIGHT (G. E.) et WINTROBE (M. M.). *Blood*, 1955, **8**, 72.
- [28] PERNA (V. P.), ROBINSON (D. W.) et STEWART (W. B.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1956, **93**, 569.
- [29] ROTH (K. L.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1954, **86**, 352.
- [30] ROTH (K. L.) et FRUMIN (A. M.). *Blood*, 1957, **12**, 217.
- [31] SAINT-PAUL (M.). *Thèse Méd.*, Paris, 1950.
- [32] SAINT-PAUL (M.), Mc A'NULTY (J.) et MOLONEY (W. C.). *Proc. Nat. Meet. Am. Fed. Clin. Res.*, 1952, rés. 96.
- [33] SAINT-PAUL (M.), MOLONEY (W. C.), Mc A'NULTY (J.) et MADDOCK (S.). *C. R. Soc. Biol.*, 1952, **146**, 857.

- [34] SAINT-PAUL (M.) et DAOULAS-LE BOURDELLÈS (F.). *Congr. Nat. Transf. Sang.*, 1956.
 - [35] SAINT-PAUL (M.), MILLOT (P.) et EYQUEM (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **90**, 402.
 - [36] SAINT-PAUL (M.). *Vie méd.*, 1958, **51**, 36.
 - [37] SAMAILLE (J.), ROPARTZ (C.), EYQUEM (A.) et GOUDEMAND (M.). *Ann. Inst. Pasteur Lille*, 1952-1953, **5**, 139.
 - [38] SAMAILLE (J.), ROPARTZ (C.) et EYQUEM (A.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **85**, 48.
 - [39] SIMONSEN (M.). *Acta path. microb. scand.*, 1953, **32**, 36.
 - [40] STAVITZKY (A. B.). *J. Immunol.*, 1954, **72**, 360 et 368.
 - [41] ULTMANN (J. E.). *Cancer Res.*, 1958, **18**, 959.
 - [42] VAUGHAN (I. H.). *Blood*, 1956, **11**, 1085.
-

CONTRIBUTION
A L'ÉTUDE DES CONDITIONS DE CONSERVATION
DE LA VIABILITÉ D'UNE SOUCHE DE BACILLE TYPHIQUE
PAR LYOPHILISATION EN VUE DE LA FABRICATION
D'UN VACCIN RADIO-INACTIVÉ

I. — ÉTUDE DE LA PHASE DE CONGÉLATION INITIALE :
RECHERCHES SUR LA RÉSISTANCE DU BACILLE TYPHIQUE
A L'EXPOSITION AUX BASSES TEMPÉRATURES

par Paule SERVANT (*), Louis REY (**)
et Paul BONÉT-MAURY (***) (****).

Les études entreprises précédemment sur la radio-inactivation des germes (Bonét-Maury) [2, 4], notamment sur les bacilles Gram négatifs (souche Ballerup [25] et *Salmonella typhi* [17]) par diverses sources de rayonnement, α et γ [3], ont montré l'intérêt de cette action. En vue de procéder à une irradiation des germes à l'état sec, l'élimination de l'eau supprimant les actions chimiques indirectes, s'exerçant à la surface des bactéries et susceptibles d'altérer leur équipement enzymatique, une étude précise des conditions optima employées pour cette lyophilisation a été entreprise.

La cryo-dessiccation des microorganismes a fait, depuis Shackel, Bordas et d'Arsonval, l'objet de nombreux travaux et la valeur de ce procédé n'est pas contestée ; mais les modes d'action du froid et de la dessiccation sont encore mal connus, les résultats varient avec les organismes mis en cause et surtout avec la manière dont interfèrent les divers facteurs introduits, notamment la température et la vitesse de congélation, les variations de cette température pendant l'expérience, le taux de sublimation, les liquides où sont suspendues les bactéries, etc. « C'est le règne de l'empirisme et chaque cas est un cas particulier » (Bretey [6 bis]).

(*) Section Technique de Recherches et d'Etudes des Services de Santé des Armées.

(**) Laboratoire de Zoologie et Physiologie de l'Ecole Normale Supérieure.

(***) Institut du Radium, Laboratoire Curie.

(****) Société Française de Microbiologie, séance du 5 février 1959.

Dans cette étude nous avons plus particulièrement pris en considération les points suivants :

1° Le produit final devra être injectable (ce qui exclut la présence des protéines protectrices du bouillon).

2° Le substrat employé ne doit pas contenir de substance préjudiciable à une bonne irradiation ultérieure et être facilement lyophilisable : ainsi certains produits à grosses molécules injectables, comme le polyvinyl, peuvent se substituer aux protéines, mais rendent la lyophilisation difficile dans les appareils ordinaires.

3° Le nombre le plus élevé possible de germes revivifiables au moment de cette irradiation doit être assuré pour arriver au but proposé, la disparition du pouvoir de multiplication étant considérée dans ce cas comme critère de dommage cellulaire.

Cette recherche a conduit tout d'abord à une étude des meilleures conditions de congélation, une mortalité très importante se produisant à ce stade.

TECHNIQUE.

Les expériences ont été effectuées à partir d'une culture de 18 heures sur gélose de la souche *Salmonella typhi* TY2S, les cultures jeunes étant moins résistantes [7]. Les germes sont mis en suspension à partir de cette culture dans le substrat étudié. Un échantillon représente un volume de 2 ml dans une ampoule de verre de 10 ml. La densité de la suspension microbienne au départ est de 1×10^9 germes/ml, mesurée à l'électrophotomètre de Meunier ; le pourcentage de survie est donné par le rapport du nombre de germes revivifiables, après congélation, au nombre de germes *revivifiables du témoin* (ce nombre étant toujours inférieur à celui donné par mesure optique : courbe théorique établie par comptage direct des germes en cellule, au microscope à contraste de phase).

Cinq à trois échantillons au moins ont été faits en même temps pour chaque examen. Les numérations ont été réalisées par la méthode des dilutions successives, avec des concentrations finales aboutissant à un nombre de colonies compris entre 200 et 400 par boîte de Petri, quatre de celles-ci étant utilisées pour chaque échantillon à mesurer.

A. TECHNIQUE DE CONGÉLATION. — L'emploi d'un congélateur centrifuge a permis de réaliser des congélations en couches minces, donc rapides et uniformes, ce qui a toujours été considéré en lyophilisation comme un facteur favorable (Guibert et Bréchet [41], Smith [30], Greaves [9]). Le dégel a été effectué de la même façon par immersion rotative pendant trente secondes

dans un bain à 37°, ce qui constitue une durée tout à fait suffisante, puisque le dégel proprement dit se produit en quelques secondes. Divers types de bains réfrigérants ont été utilisés. Jusqu'à -80° nous avons employé des mélanges d'alcool et de glace carbonique. Pour les températures plus basses nous avons utilisé soit l'azote liquide (-196°), soit du propane liquide refroidi par un bain périphérique d'azote liquide selon une technique décrite précédemment [27]. Les séjours de quatre heures à ces basses températures ont été réalisés, après congélation ainsi obtenue, par transfert dans une enceinte métallique refroidie qui fonctionne par évaporation d'azote liquide. La température est réglée par un thermistor relié à un régulateur électronique. La stabilité à l'intérieur de la masse métallique est de $\pm 1/10$ de degré. Cette enceinte a été mise au point par J. Mosnier et L. R. Rey.

Quelques essais comparatifs préalables ont été faits pour un même échantillon congelé :

- 1° En couche mince ;
- 2° En culot liquide.

Les résultats groupés dans le tableau I montrent l'avantage du premier procédé sur la simple congélation.

TABLEAU I.

Congélation en Eau Physiologique sous forme de :	Temps en Minutes	Températures	% de Germes Survivants
Couche mince	2	-20°	44
Culot	5		40
Couche mince	2	-40°	16,2
Culot	5		8,3
Couche mince	2	-50°	8,3
Culot	5		6
Couche mince	2	-196°	11,4
Culot	5		5,6

B. RÉSULTATS. — Au cours de cette étude de la congélation nous avons envisagé les divers points suivants :

- 1° La température finale atteinte ;
- 2° Le substrat ;
- 3° Le temps de séjour.

1° La courbe inférieure de la figure 1 relative à une suspension en eau physiologique (NaCl, 9 p. 1 000) montre qu'après une congélation rapide, un temps de séjour de deux minutes à la température choisie et un dégel en trente secondes, une chute brutale du nombre de germes revivifiables se produit dans la

zone située au-dessous de -30° . Toutefois, à -196° on obtient une légère amélioration, constatée aussi par Greaves [10], avec *Escherichia coli*, en milieu protidique.

2^e Pour un même temps de séjour de deux minutes, la même congélation en couche mince fut réalisée à partir de germes mis en suspension dans :

a) Un soluté glucosé de 10 p. 100 (glucose ; eau distillée) ;

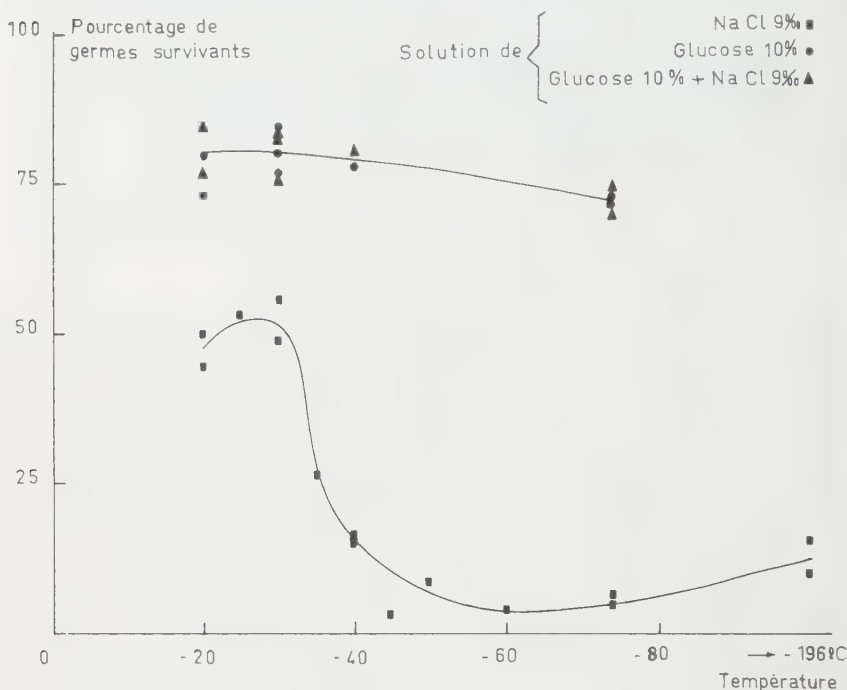


FIG. 1. — Courbes des pourcentages de survie après congélation à températures diverses des germes suspendus en soluté physiologique, soluté glucosé, soluté glucosé salé. Durée : deux minutes.

b) Un soluté glucosé salé (glucose, 10 p. 100 ; eau physiologique, 9 p. 1 000).

La courbe supérieure de la figure 1 montre l'absence de zone critique, aussi bien avec le substrat glucosé qu'avec le substrat glucosé salé, l'action protectrice du glucose empêchant les altérations provoquées par la cryoconcentration du NaCl au cours d'un séjour de deux minutes aux basses températures. Divers travaux [19, 28] ont montré, en effet, qu'au cours du refroidissement, l'eau se sépare sous forme de glace pure provoquant par

là même une augmentation considérable de la tonicité de la phase liquide résiduelle : ceci se produit quelle que soit la concentration initiale en sel de la solution. On voit que dans ce cas (2°) l'importance de la température de congélation est proportionnellement assez faible ; il n'y a pas de chute brutale, mais une décroissance progressive du pourcentage de survie.

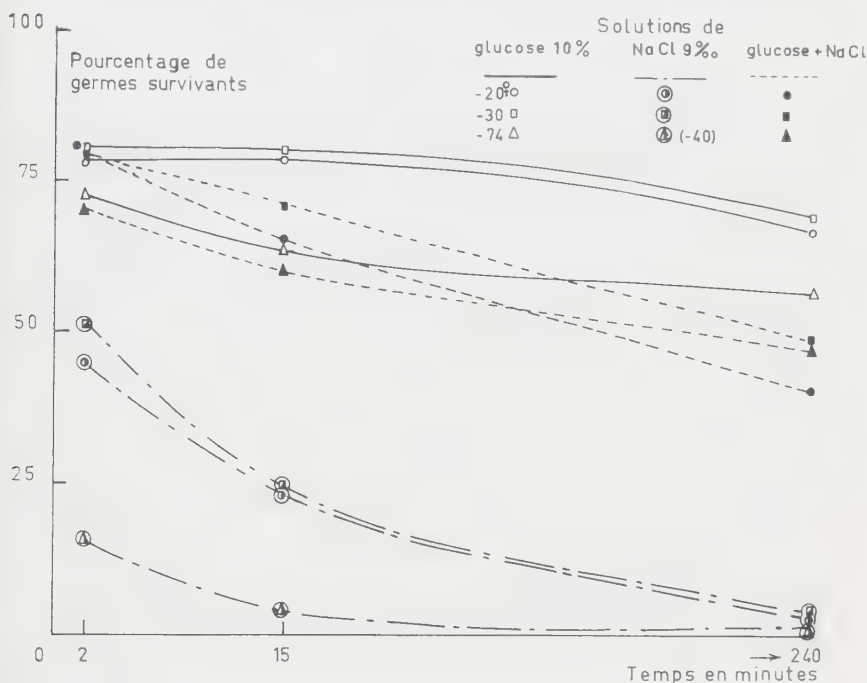


FIG. 2. — Courbes des pourcentages de survie après congélation à températures diverses, des germes suspendus en soluté physiologique, soluté glucosé et soluté glucosé salé pendant un temps de deux minutes, quinze minutes et quatre heures.

3° *Temps de séjour.* — Dans la figure 2 sont représentées les courbes correspondant à des temps de congélation de deux minutes, quinze minutes et quatre heures.

Nos expériences ont montré qu'en milieu physiologique et quelle que soit la température de congélation employée (au-dessus et au-dessous de la zone critique), le temps de séjour avait une très grande importance ; la survie finale est extrêmement faible et sensiblement du même ordre pour toutes les températures. En solution glucosée cet effet du temps de séjour est tout à fait réduit, mais l'action nocive de la concentration saline, pour des temps

supérieurs à deux minutes, est marquée même en présence de glucose, ainsi qu'il résulte de la comparaison des deux groupes de courbes obtenues en milieu glucosé simple et glucosé salé.

Quelques essais comparatifs avec le lactose (15 p. 100) et le saccharose (1,25 p. 100) ont donné des courbes comparables. Le meilleur pourcentage de survie est obtenu par le glucose, puis le lactose et enfin le saccharose, pour les concentrations utilisées.

DISCUSSION.

Le mécanisme de défense des germes contre les actions nocives exercées aux basses températures et l'importance des divers facteurs influençant le taux de survie sont assez controversés. Guibert et Bréchet [5, 11], dans leur étude sur la lyophilisation des levures, insistent sur l'importance de la vitesse de congélation. Par l'emploi de récipients de différente conductibilité thermique (verre et fer), ils congèlent les suspensions à une même température, avec une vitesse égale, en partant de sources froides à températures inégales. Dans ce cas, les taux de survie sont comparables. Par contre, si cette même température est atteinte à partir de sources froides égales (d'où vitesses inégales), le pourcentage de survie est beaucoup plus faible dans le verre que dans le fer, ceci pour une température optima comprise entre -20° et -25° C.

Pour Haines [12], l'action de la concentration saline sur les germes serait une des causes de la floculation des protéines cellulaires aboutissant à la mort.

Une étude systématique de cette action nous a montré une chute importante du nombre de germes survivants lorsque la concentration du NaCl dépasse 25-30 p. 1 000. Elle atteint 90 p. 100 pour une concentration de 200 p. 1 000. Or, nous avons vu que pendant le processus de formation de la glace, la concentration en NaCl augmente de façon considérable dans le liquide résiduel où se trouvent les bactéries.

Le tableau II montre le pourcentage de germes revivifiables à diverses concentrations salines pour des temps de quatre à vingt-quatre heures à 4° par rapport au nombre total de germes vivants du témoin.

Il faut noter que le pourcentage de germes revivifiables du témoin par rapport au nombre total de germes (morts et vivants), déterminé optiquement, décroît sensiblement à partir de 25-30 de NaCl p. 1 000, de telle sorte que le pourcentage final des germes revivifiables par rapport au nombre de germes mis en suspension à l'origine est extrêmement faible [voir colonne (c) du tableau II]. Il convient toutefois, au cours de ces mesures, de tenir compte de la variation de la densité optique du milieu en fonction de

sa tonicité. Il semble que ce phénomène soit lié à la viabilité des germes (Mager, Kuczynski, Berg et Avidor [24]).

Or, d'autre part, la mortalité est beaucoup plus élevée lorsque la congélation s'effectue en eau distillée; elle semble, d'après Keith [48], « due à la complète cristallisation du milieu, qui n'offre plus de refuge aux corps bactériens contre l'action broyante des cristaux de glace extracellulaire ». Cette opinion est par-

TABLEAU II. — Influence de la concentration saline.

Milieu	Pourcentage du Nbre. de germes vivants dans le Témoin par rapport au Nbre. de germes initial donné par néphélémétrie.	Pourcentage du Nbre. de germes vivants par rapport au Nbre. de germes vivants du témoin après :		Pourcentage du nombre de germes vivants par rapport au nombre de germes initial donné par néphélémétrie. Après :	
		4 h. à 4°	24 h. à 4°	4 h. à 4°	24 h. à 4°
Bouillon	99 (6)	99,5 (3)	99 (3)	99	99
Eau Distillée	41 (6)	79 (2)	49,6(3)	32,3	20,5
NaCl 5p.1000	55,9 (4)		50 (3)		28
- 9,5 -	73 (6)	87 (2)	80 (4)	63,5	58,5
- 15 -	49,25(4)		60 (4)		29,5
- 20 -	46,5 (4)		47,5(4)		22
- 25 -	44,4 (6)	42 (2)	38,8(3)	18,7	17,2
- 30 -	25,3 (6)		30 (3)		7,6
- 40 -	30,5 (4)		28 (3)		8,5
- 50 -	31 (5)	36,7 (2)	24,5(2)	11,3	7,5
- 100 -	17 (5)	39,2 (3)	13,7 (2)	6,6	2,35
- 200 -	15 (4)	26,4 (2)	9,2 (2)	3,94	1,35
- 300 -	11,1 (4)	28 (2)	6,2 (2)	3,1	0,67
Saturation	7,6 (4)	27 (2)	3 (2)	2,06	0,23
	(a)	(b)		(c)	

Entre parenthèses : nombre d'expériences.

tagée par Hillard et Davis [16]; ils la justifient par l'effet protecteur des colloïdes et par l'augmentation de la mortalité résultant de congélations répétées. Cette action mécanique de la glace est considérée également par Harrison [14] et par Harrison et Cerroni [15] comme une des raisons de mort. L'étude de la chute du nombre de germes revivifiables en fonction du point eutectique du substrat ne nous a pas donné de résultats probants à ce sujet. Stamp [33] avait montré que, sauf pour quelques organismes très fragiles, la dessiccation au-dessous du point eutectique n'était pas essentielle.

Pour Squires et Harstell [32], le processus de mort se produirait jusqu'à ce que les colloïdes de la cellule bactérienne arrivent à s'équilibrer avec les solutés qui la contiennent. La présence d'éléments étrangers dans l'eau modifiant le processus de formation de la glace, il y aurait limitation de la pression mécanique

exercée sur les cellules par la glace *extracellulaire*, lorsqu'une concentration extérieure plus élevée entraînerait une déshydratation des cellules ; par contre, une concentration plus élevée à l'intérieur des cellules entraînerait une augmentation de pression, c'est-à-dire une mortalité accrue.

Une autre cause de mortalité très généralement proposée est la formation de glace *intracellulaire*. Etudiant l'action de la congélation sur les spermatozoïdes des grenouilles avec Hodapp [20] et avec Keane [22] sur le cœur d'embryon de poulet, Luyet montra l'effet protecteur des solutions sucrées hypertoniques. Ils pensent que ces solutions agissent en déshydratant les cellules et permettent ainsi à l'eau intracellulaire de se vitrifier plutôt que de cristalliser. La protection due à la glycérine (Luyet et Gehenio [21], Luyet et Keane [23], Rey [27] semblerait se rattacher à cette réduction de la glace ainsi qu'il ressort de l'expérience de Smith et Smiles [31] qui attribuent l'effet protecteur d'une solution de Ringer additionnée de 15 p. 100 de glycérine à l'absence de formation de glace intracellulaire *visible* lors de la congélation des spermatozoïdes géants de cobayes.

Mazur [24], dans un article récent, a étudié la survie de *Pasteurella tularensis*, en suspension soit en gélatine salée, soit en milieu glucidique : il constate l'existence dans le premier cas, entre -30° et -45° , d'une zone critique où se produit une chute brusque du pourcentage de survie, ce phénomène ne se produisant plus en solution sucrée.

Or, les solutions employées étaient iso- ou hypotoniques ; de plus, le refroidissement était suffisamment lent (1° C par minute) pour éviter la vitrification ; Mazur ne pense donc pas que les solutions sucrées protègent les cellules par déshydratation, mais plutôt par suite de la pénétration dans ces cellules des sucres qui empêchent la formation de glace intracellulaire : la présence ou l'absence de cette dernière dans les germes congelés est toutefois encore du domaine de la spéculation.

Il semble bien, et c'est l'opinion de Fry [8] et de Greaves [9], que quelle qu'en soit l'explication valable, le glucose exerce une sorte d'action régulatrice sur la quantité d'eau résiduelle. Cette action bénéfique est sensible même en milieu protidique et augmente notablement la protection obtenue (Annear [4], Fry et Greaves [8]).

Lors du I^{er} Congrès International du BCG en 1948, Bretey, van Deinse et Sénéchal avaient montré également [6] l'intérêt de diverses substances telles que le glucose, qui facilitent le maintien d'une certaine humidité résiduelle, et leur intérêt dans le vaccin BCG lyophilisé. Veerarachavan [34] a montré récemment que la présence de 5 p. 100 de glucose diminuait, pour le virus rabique, la chute du titre se produisant au cours de la lyophilisation.

RÉSUMÉ.

En vue de la préparation ultérieure d'un vaccin typhoïdique radio-inactif injectable, des recherches ont été entreprises pour déterminer les conditions optima de congélation préalable à la lyophilisation.

Ont été analysées séparément : l'influence de la température finale, de la nature du substrat (eau physiologique, solution glucosée ou mélange des deux) et du temps de séjour aux basses températures pour une suspension de bacilles typhiques.

La congélation en couche mince, à une température égale ou inférieure à -30° d'une suspension microbienne de *Salmonella typhi* en milieu liquide glucosé 10 p. 100 assure un pourcentage satisfaisant de survie. Le substrat utilisé est simple, parfaitement injectable et permettrait, pour les germes lyophilisés, l'irradiation ultérieure dans de bonnes conditions par le rayonnement γ du cobalt.

SUMMARY

PRESERVATION OF VIABILITY OF A *Salmonella* STRAIN

BY MEANS OF FREEZE-DRYING WITH

A VIEW TO THE PRODUCTION OF A RADIO-INACTIVATED LIVING VACCINE.

I. — STUDY OF THE INITIAL THAWING PHASE.

RESISTANCE OF TYPHOID BACILLUS TO LOW TEMPERATURES.

Optimal conditions for thawing before freeze-drying are studied. The influence of final temperature, of the substrate (saline, glucose-solution, or a mixture of both media), of duration of the action of low temperatures on a suspension of typhoid bacilli has been studied.

A satisfactory survival rate of the germs is obtained by freezing in thin layers at a temperature of or inferior to 30° , in a liquid, 10 % glucose medium. This substrate is simple, easily inoculated and should allow a subsequent irradiation of freeze-dried germs by cobalt γ rays.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] ANNEAR (D. I.). *Nature*, 1954, **174**, 359.
- [2] BONÉT-MAURY (P.) et OLIVIER (H. R.). *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1937, **18**, 600 ; *C. R. Acad. Sci.*, 1939, **209**, 459.
- [3] BONÉT-MAURY (P.), SERVANT (P.) et DEYSINE (A.). *Rad. Res.*, 1958, **9**, n° 1.
- [4] BONÉT-MAURY (P.). *J. Radiol. Electrol.*, 1947, **28**, 463.
- [5] BRÉCHOT (P.), GUIBERT (L.) et M^{me} CROSON. *Ann. Inst. Pasteur*, 1958, **95**, 62.

- [6] BRETEY (J.), DEINSE (F. van) et SÉNÉCHAL (F.). *1^{er} Congrès Intern. du BCG*, juin 1948, 31.
 - [6 bis] BRETEY (J.). *Bull. Acad. Méd.*, 1958, **142**, 575.
 - [7] FISCHER. *Nature*, 1954, **174**, 349.
 - [8] FRY (R. M.) et GREAVES (R. I. N.). *J. Hyg.* 1951, **49**, 220.
 - [9] GREAVES (R. I. N.). *Freezing and drying*, 1954, 87, Acad. Press, New York.
 - [10] GREAVES (R. I. N.). *Canad. J. Microb.*, 1956, **2**, 365.
 - [11] GUIBERT (L.) et BRÉCHOT (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **88**, 750.
 - [12] HAINES (R. B.). *Proc. roy. Soc. Biol.*, 1937-1938, **124**, 451.
 - [13] HARRISON (A. P.). *J. Bact.*, 1955, **70**, 711.
 - [14] HARRISON (A. P.). *Antonie v. Leeuwenhoek*, 1956, **22**, 407.
 - [15] HARRISON (A. P.) et CERRONI (R. E.). *Bact. Proc.*, 1956, 59.
 - [16] HILLARD (C. H.) et DAVIS (M. A.). *J. Bact.*, 1918, **3**, 423.
 - [17] JUDE (A.), BONÉT-MAURY (P.) et SERVANT (P.). *C. R. Soc. Biol.*, 1950, **144**, 214.
 - [18] KEITH (S. C.). *Science*, 1913, **37**, 877.
 - [19] LOVELOCK (J. E.). *Biophysical aspects of the freezing of living cells in preservation and transplantation of normal tissues*. Ciba Found., Symp., Churchill, édit., Londres, 131.
 - [20] LUYET et HODAPP (E. I.). *Proc. Soc. exp. Biol.*, 1938, **39**, 433.
 - [21] LUYET (B. J.) et GEHENIO (P. N.). *Biodynamica*, 1952, **7**, 107.
 - [22] LUYET (B. J.) et KEANE (J. F.). *Biodynamica*, 1952, **7**, 119.
 - [23] LUYET (B. J.) et KEANE (J. F.). *Biodynamica*, 1953, **7**, 141.
 - [24] MAZUR (P.), RHIAN (M. A.) et MAHLANDT (B. J.). *J. Bact.*, 1957, **73**, 395.
 - [25] MAGER (J.), KUCZINSKI (M.), SCHATZBERG (G.) et AVIDOR (V.). *J. gen. Microb.*, 1956, **14**, 69.
 - [26] OLIVIER (H. R.) et BONÉT-MAURY (P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1946, **72**, 222.
 - [27] REY (L. R.). *J. Embryol.*, 1958, **6**, 171.
 - [28] REY (L. R.). *Bull. Inst. Inter. Froid*, Paris, 1957, **37**, n° 5, 1115.
 - [29] SERVANT (P.), BONÉT-MAURY (P.) et JUDE (A.). *C. R. Soc. Biol.*, 1950, **144**, 216.
 - [30] SMITH (A. V.). *Effects of low temperatures on living cells and tissues. Biological application of freezing and drying*, Harris, édit., 1954, 31.
 - [31] SMITH et SMILES (J.). *J. roy. micr. Soc.*, 1953, **73**, 134.
 - [32] SQUIRES (R. W.) et HARTSELL (S. F.). *Appl. Microbiol.*, 1955, **3**, 40.
 - [33] STAMP (L.). *J. Canad. Microb.*, 1947, **1**, 251.
 - [34] VEERARAGHAVAN (N.). *B. O. M. S.*, 1957, **17**, 937.
-

**PROPRIÉTÉS BIOCHIMIQUES
DES GERMES COLIFORMES HÉMOLYTIQUES
ISOLÉS AU COURS
DU SYNDROME ENTÉROTOXIQUE COLIBACILLAIRE
DU PORCELET**

par CL. QUINCHON, M. HENRY et M^{me} G. HENRY (*).

(*Laboratoire Central de Recherches Vétérinaires, Alfort*
[Directeur : professeur J. VERGE])

Gregory (1955) a signalé la présence quasi constante de germes coliformes β -hémolytiques dans le contenu intestinal de porcelets morts de maladie des œdèmes. A la même époque, Schofield et Davis (1955) isolaient un germe hémolytique à partir des excréments de porcs contaminés. Depuis, ces bacilles ont été régulièrement associés à la maladie, aussi bien sous sa forme hémorragique que sous sa forme œdémateuse. Leur rôle dans son étiologie ne semble plus douteux depuis que les auteurs américains et anglais en ont reproduit les signes cliniques et les lésions chez le porc, par ingestion de culture ou par injection intraveineuse d'une toxine extraite des corps bactériens par congélations et décongélations successives (Erskine, Sojka et Lloyd, 1957). Nous avons rapporté par ailleurs nos constatations sur cette affection (Quinchon, Henry et M^{me} Henry, 1958).

Si la maladie a fait l'objet de nombreuses publications ces dernières années, la bibliographie est inexistante en ce qui concerne les souches isolées. Leurs caractéristiques antigéniques ont été étudiées en Grande-Bretagne (Sojka, Erskine et Lloyd, 1957) et aux Etats-Unis (Ewing, Tatum et Davis, 1958). Seuls Gitter et Lloyd (1957) ont donné les caractères biochimiques de quatre souches. Nous présentons ici les résultats d'une étude qui porte sur 27 souches.

TECHNIQUE D'ISOLEMENT.

Toutes les souches, sauf une, ont été isolées par nos soins, à partir de cadavres de porc, en utilisant la technique suivante.

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 8 janvier 1959.

Après ouverture de la cavité abdominale, une section d'intestin grêle d'une vingtaine de centimètres est isolée entre deux ligatures. 10 cm³ environ de bouillon de viande stérile sont introduits dans la lumière à l'aide d'une pipette à boule, pour mettre en suspension le contenu intestinal parfois peu abondant. Après quelques minutes de contact, 1 goutte du mélange est portée aseptiquement dans un tube de bouillon de viande. Cette dilution très étendue sert de matériel d'ensemencement des divers milieux d'isolement utilisés dans l'étude de la flore intestinale, en particulier d'une gélose au sang de mouton à 10 p. 100, inclinée en tube. Cette gélose est placée à l'étuve à 37° pendant dix-huit heures. Plusieurs colonies hémolytiques sont prélevées et identifiées les jours suivants. Le germe est toujours très abondant dans le contenu intestinal et son isolement ne présente aucune difficulté. Nos souches ont été conservées en milieu de Kauffmann.

Le petit nombre de souches étudiées s'explique quand on sait que leur diffusion dans l'organisme est exceptionnelle : nous avons isolé le germe une seule fois à partir de la moelle osseuse. Sa mise en évidence a été facile chaque fois que nous avons disposé d'un cadavre. Bien souvent, malheureusement, nous n'avons reçu d'autres prélèvements qu'un fragment de carcasse (patte) ou de viscères (foie, rate), alors qu'une anse intestinale aurait été indispensable.

MOYENS D'ÉTUDE.

Les caractères biochimiques de nos souches ont été étudiés selon les méthodes classiques.

La fermentation des glucides et des alcools a été recherchée en eau peptonée renfermant 1 p. 100 de ces substances, l'indicateur de pH étant le bleu de bromothymol. Après ensemencement, les tubes de culture ont été placés à 37° pendant trente jours et examinés quotidiennement. La production de gaz a été recherchée dans les tubes d'eau peptonée glucosée.

Le pouvoir hémolytique a été confirmé par ensemencement sur gélose au sang de mouton à 10 p. 100 coulée en boîte de Petri. La mobilité a été observée en gélose molle à 5 p. 1 000, la production d'indole en eau peptonée contrôlée, après quarante-huit heures d'étuve, à l'aide du réactif de Kovacs. Nous avons recherché :

- 1° L'utilisation du citrate de sodium sur le milieu de Simmons ;
- 2° La production d'hydrogène sulfuré sur gélose au sous-acétate de plomb ;
- 3° L'action sur le lait tournesolé ;
- 4° Le développement dans le milieu de Braun au cyanure de potassium ;
- 5° La réduction des nitrates en nitrites ;

6° Le pouvoir gélatinolytique sur la gélatine nutritive ;

7° Les réactions du rouge de méthyle et de Voges-Proskauer (technique de Barritt) sur le milieu de Clark et Lubs ;

8° L'existence d'une lysine-décarboxylase (L. D. C.) sur une gélose préparée avec la peptone Difco.

L'existence d'une uréase a été recherchée avec un soin particulier. A l'isolement nous avons employé le milieu de Fergusson. Lors de l'étude d'ensemble, c'est le milieu de Christensen (fabrication Oxoid) qui a été utilisé, avec ensemencement de contrôle sur gélose dépourvue d'urée. Enfin, les résultats positifs ont été vérifiés sur le milieu urée-indole de Roland, Bourbon et Sztürm, délivré par Serpasteur.

RÉSULTATS.

Les germes étudiés (bacilles non colorés par la méthode de Gram, de 2-3 μ sur 0,5, dépourvus de spore et de capsule) se développent très bien sur les milieux usuels, sans addition de facteurs de croissance. La culture est luxuriante sur la gélose ordinaire. Bouillon de viande et eau peptonée sont rapidement troublés ; le dépôt au fond des tubes est abondant après quarante-huit heures d'étuve à 37°. Sur gélose au sang, l'hémolyse est importante et totale d'emblée ; autour d'une colonie isolée, le halo clair atteint 1 cm de diamètre en quarante-huit heures. En milieu liquide, une hémolysine active est présente à la huitième heure de culture. Quatre de nos souches ont perdu cette hémolysine peu après leur isolement. Elles ne figurent pas dans cette étude d'ensemble.

Voici les caractères communs aux 27 souches étudiées : le citrate de sodium n'est pas utilisé comme source unique de carbone ; la gélatine n'est pas liquéfiée ; le lait tournesolé est acidifié en vingt-quatre heures puis coagulé plus ou moins rapidement. Aucune ne se développe dans le milieu au cyanure de potassium de Braun ; elles réduisent les nitrates en nitrites ; la production d'hydrogène sulfuré est nulle ou insignifiante. La réaction au rouge de méthyle est positive ; mais il n'y a pas formation d'acétyl-méthyl-carbinol. Dix-neuf souches possèdent une lysine-décarboxylase et toutes sont indologènes, sauf une. Elles sont généralement mobiles, sauf huit qui présentent en outre quelques particularités : quatre sont anaérogènes, une cinquième anindologène, les autres se distinguent par leurs réactions fermentaires.

Sont acidifiés par toutes les souches, en vingt-quatre heures, avec production de gaz, aux quatre exceptions près signalées ci-dessus : xylose, arabinose, rhamnose, glucose, mannose, lévulose, lactose, maltose, sorbitol, mannitol. Donnent des résultats variables : saccharose, sorbose, dulcitol et salicine ; cette dernière

substance n'est jamais fermentée en vingt-quatre heures. Adonitol et inositol n'ont pas été attaqués après une incubation de trente jours.

Seize souches présentent une activité uréasique plus ou moins

Nombre de souches	16	5	3	1	1	1
Mobilité	+	0	0	0	0	+
		sauf 1 +	sauf 1 +			
Gaz	+	0	+	+	0	+
		sauf 2 +				
Indole	+	+	+	0	+	+
Citrate	0	0	0	0	0	0
Gélose au plomb	0	0	0	0	0	0
Gélatine	0	0	0	0	0	0
C N K	0	0	0	0	0	0
Nitrates	+	+	+	+	+	+
R. M.	+	+	+	+	+	+
V. P.	0	0	0	0	0	0
L. D. C.	+	+	0	+	0	+
		sauf 2:0	sauf 1:0	sauf 1:+		
Urée	+	0	0	0	0	0
Xylose	+	+	+	+	+	+
Arabinose	+	+	+	+	+	+
Rhamnose	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+	+	+
Lévulose	+	+	+	+	+	+
Saccharose	0	+	+	0	0	0
Sorbose	0	+1-2	+1-4	0	+2	0
Lactose	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+
Dulcitol	+1-4	+1-4	+2-4	+	0	0
Adonitol	0	0	0	0	0	0
Inositol	0	0	0	0	0	0
Salicine	+2	0	+2-6	+2	+2	+2

intense. Nous avons obtenu des résultats concordants avec les différents milieux utilisés, bien que la gélose à l'urée de Christensen nous ait semblé moins sensible que les milieux synthétiques.

Les résultats obtenus sont réunis dans le tableau ci-joint qui

fait apparaître un groupe homogène de 16 souches : elles possèdent une uréase, font fermenter le dulcitol et la salicine, mais n'attaquent pas le saccharose et le sorbose (1).

DISCUSSION.

Les germes étudiés répondent tous à la définition des Entérobactéries donnée par Kauffmann : « Bacilles Gram-négatifs, mobiles ou immobiles, qui poussent sur les milieux usuels, font fermenter le glucose rapidement avec ou sans production de gaz et réduisent les nitrates en nitrites ».

Dans cette grande famille, nos souches se classent parmi les groupes qui font fermenter le lactose rapidement : *Escherichia*, *Klebsiella*, *Cloaca-Aerobacter*. Ces deux derniers sont éliminés d'emblée puisque l'on y range les Entérobactéries qui utilisent le carbone du citrate de sodium, ont une réaction de Voges-Proskauer positive et cultivent en présence de cyanure de potassium. Ces critères font de nos souches des *Escherichia*.

Ce genre comprend deux espèces, *Escherichia coli* et *Escherichia freundii*, classiquement distinguées suivant la production d'indole et d'hydrogène sulfuré et le développement sur les milieux de Simmons et de Braun. D'après leurs caractères, négatif pour ceux-ci et positif pour celui-là, les souches que nous avons isolées sont des *Escherichia coli*. Mais, selon Kauffmann, « sont habituellement considérées comme appartenant à l'espèce *Escherichia coli*, les souches qui produisent de l'indole, n'attaquent pas l'urée, ne liquéfient pas la gélatine, donnent une réaction de Voges-Proskauer négative et une réaction positive au test au rouge de méthyle ».

Alors que faire de nos souches qui possèdent une uréase ? Nous n'avons trouvé mention de ce caractère que dans le travail de S. Le Minor et coll. (1954) sur les propriétés biochimiques des *Escherichia coli* des gastro-entérites infantiles. Ces auteurs signalent une souche du groupe O26 : B6 capable d'hydrolyser l'urée ; elle provient du Danemark et a été considérée comme atypique.

RÉSULTATS ET CONCLUSIONS.

Nous avons étudié les propriétés biochimiques de 27 souches, isolées au cours du syndrome entérotoxique colibacillaire du porclet, qui présentent les caractères d'*Escherichia coli*, et dont 16 possèdent une uréase.

(1) Nous adressons nos plus vifs remerciements à M. le Dr Thibault, chef de service à l'Institut Pasteur, qui a bien voulu vérifier les caractères de quelques-unes de nos souches et nous a conseillé au cours de notre étude.

SUMMARY

BIOCHEMICAL PROPERTIES OF HEMOLYTIC COLIFORM GERMS
ISOLATED IN THE COLIBACILLARY ENTEROTOXIC SYNDROM OF YOUNG PIGS.

Study of 27 strains, possessing *Escherichia coli* properties,
16 of which being urease-positive.

BIBLIOGRAPHIE

- ERSKINE (R. G.), SOJKA (W. J.) et LLOYD (M. K.). *Vet. Rec.*, 1957, **69**, 301.
- EWING (W. H.), TATUM (F. W.) et DAVIS (B. R.). *Cornell Vet.*, 1958, **48**, 201.
- GITTER (M.) et LLOYD (M. K.). *Brit. Vet. J.*, 1957, **113**, 212.
- GREGORY (D. W.). *Vet. Med.*, 1955, **50**, 609.
- KAUFFMANN (F.). *Enterobacteriaceae*. 2^e édit., Munksgaard, édit., Copenhagen, 1954.
- LE MINOR (S.), LE MINOR (L.), NICOLLE (P.) et BUTTIAUX (R.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1954, **86**, 204.
- QUINCHON (Cl.), HENRY (M.) et HENRY (M^{me} G.). *Rec. Med. Vet.*, 1958, **134**, 437.
- SCHOFIELD (F. W.) et DAVIS (D.). *Canad. J. comp. Med.*, 1955, **19**, 242.
- SOJKA (W. J.), ERSKINE (R. G.) et LLOYD (M. K.). *Vet. Rec.*, 1957, **69**, 293.
-

EFFET DU CALCIUM SUR LA PÉNÉTRATION D'UN PHAGE DANS CERTAINES BACTÉRIES SENSIBLES

par M. P. BEUMER-JOCHMANS, J. DIRKX
et S. OLEFFE-KOOPMANSCH (*).

(Institut Pasteur de Bruxelles)

Nous avons montré précédemment que le phage H-SHPB(Ca), fixé en l'absence de calcium sur la souche sensible de *Shigella flexneri* F6, forme S (F6S), demeure neutralisable par le sérum anti-phage, bien que se multipliant dans ces conditions [1]. Par contre, lorsqu'il se fixe sur F6S en milieu calcifié, H-SHPB(Ca) échappe instantanément à l'action du sérum anti-phage.

Il semble que le comportement anormal de H-SHPB(Ca) fixé sur F6S en absence de calcium soit lié au caractère S de ce germe. En effet, fixé sur la forme R de F6 (F6R) ou sur les souches SHPB ou Y6R qui sont de type R également, H-SHPB(Ca) échappe à la neutralisation par le sérum anti-phage, que la fixation ait eu lieu en milieu calcifié ou non [2]. Par ailleurs, l'étude des conditions cationiques qui régissent la fixation de H-SHPB(Ca) sur les germes sensibles [3, 4], nous a conduits à penser que, lorsque la barrière de potentiel est abolie, un obstacle, vraisemblablement constitué par l'antigène caractéristique de la forme S, gêne, par un mécanisme que nous ignorons encore, l'accès de H-SHPB(Ca) au récepteur du phage porté par F6S, ainsi que sa pénétration dans cette bactérie.

Si notre interprétation est exacte, H-SHPB(Ca) et F6S constituent un système particulièrement favorable à l'étude de la pénétration du phage dans la bactérie sensible. Avant d'entreprendre cette étude, nous nous sommes efforcés d'établir le plus exactement possible les conditions dans lesquelles H-SHPB(Ca), fixé sur F6S, demeure neutralisable par le sérum anti-phage. Nous avons également recherché s'il est correct d'interpréter la sensibilité aux anticorps du phage fixé comme l'indice d'une absence

(*) Manuscrit reçu le 30 janvier 1959.

ou d'un ralentissement de la pénétration du phage dans la bactérie hôte. Enfin, le rôle du calcium dans la pénétration de H-SHPB(Ca) dans F6S a été précisé. Ce sont les résultats de cette étude préliminaire qui sont rapportés ici.

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

Le phage H-SHPB(Ca), les souches de *Shigella dysenteriae*, SHPB et *Shigella flexneri* F6S (sérotypé 5) et les milieux utilisés pour l'étude de la fixation (solutions de maléates de différents cations) ont été décrits précédemment [3]. La souche F263 est une souche de *Shigella flexneri*, sérotypé 2 a, récemment isolée chez un malade atteint de dysenterie, nous en avons isolé la forme R (F263R).

Les titrages du phage ont été effectués selon la technique déjà décrite [3], modifiée par substitution du milieu LA [5] au bouillon de viande gélosé utilisé précédemment.

Le milieu LB [5] a remplacé le bouillon de viande pour la culture des bactéries sensibles. Les suspensions de bactéries sensibles en solution de maléates, destinées à l'étude de la fixation, sont préparées à partir de cultures en LB, âgées de 2 heures ; elles contiennent habituellement 150 à 250.10⁷ germes par millilitre.

Pour l'étude de la fixation, le phage est dilué de manière à introduire dans la suspension de bactéries sensibles environ un phage pour 50 à 100 germes. Cette dilution se fait en milieu LB dilué au 1/6 en eau distillée (LB/6) qui assure une bonne conservation du phage tout en étant suffisamment pauvre en cations, Ca⁺⁺ notamment, pour ne pas altérer de façon décelable les conditions cationiques de la fixation.

Les sérums anti-H-SHPB(Ca), anti-F6S et anti-SHPB ont été obtenus chez des lapins immunisés par voie intraveineuse. Les sérums sont chauffés une demi-heure à 56° C. Avant l'emploi, le sérum anti-H-SHPB(Ca) est débarrassé des anticorps anti-microbiens par 5 à 6 contacts de deux à trois heures à 37° C avec SHPB vivant : cinq à six fois 10 cg de corps microbiens, poids frais, pour 10 à 12 ml de sérum.

A l'exception des expériences destinées à étudier l'action de différents cations sur la fixation, nous avons toujours opéré en maléate de Na, 0,4 M en Na⁺. Ce maléate assure une bonne conservation du phage libre et se rapproche plus que les autres des conditions ioniques de nos milieux de culture usuels, très riches en cations Na⁺ (0,2 à 0,4 M).

La sensibilité au sérum anti-phage de H-SHPB(Ca) fixé a toujours été éprouvée de la manière suivante :

L'infection de F6S par H-SHPB(Ca) est réalisée dans le maléate de chaque cation à la concentration optimale. Les bactéries infectées sont centrifugées à froid, séparées du liquide surnageant, puis resuspendues au volume initial dans le maléate à l'étude. Cette suspension est immédiatement diluée au 1/100 dans le maléate, puis encore au 1/10 dans le sérum anti-H-SHPB(Ca), lui-même dilué au 1/20 en LB/6 et préalablement porté à 37° C au bain-marie. Le mélange est maintenu dix minutes au bain-marie à 37° C, puis dilué au 1/10 en bouillon glacé

et étalé en vue du dénombrement des centres infectieux. Un premier témoin au sérum normal de lapin est réalisé de manière identique. Un second témoin, constitué de phage libre + sérum anti-phage, est ajouté pour contrôler l'activité du sérum.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX.

1^e FIXATION DU PHAGE H-SHPB(Ca) SUR F6S DANS LES MALÉATES DE DIFFÉRENTS CATIONS. — L'étude de la fixation de H-SHPB(Ca) sur F6S avait été faite précédemment dans les maléates de Na et de Ca [3, 4]. Etendue aux maléates de K, NH_4 , Ba, Mg et Sr, elle n'a fait que confirmer nos résultats antérieurs, à savoir : que la fixation sur F6S exige des concentrations cationiques plus élevées que sur SHPB et n'est pas inhibée par les fortes concentrations en cations monovalents ou en Mg^{++} , qui sont inhibitrices de la fixation sur SHPB. Le fait que les cations monovalents sont environ vingt fois moins efficaces que les bivalents pour la fixation est également confirmé. Au cours de cette étude, nous avons observé que le nombre de centres infectieux formés par les bactéries F6S infectées dans les maléates de certains cations, est toujours inférieur à ce que l'on peut prévoir en soustrayant le nombre de particules de phage non fixées de la totalité des particules de phage introduites au début de l'expérience, même dans les maléates qui assurent une bonne conservation du phage libre. Ce fait est particulièrement net en maléate de Sr, où il s'observe à toutes les concentrations qui permettent la fixation, mais est d'autant plus marqué que la concentration en Sr est plus élevée. Nous donnons ici un exemple :

On introduit 685.10^5 phages par millilitre de maléate de $\text{Sr } 10^{-1} \text{ M}$ et par millilitre de suspension bactérienne dans ce maléate. A la fin de l'expérience, nous retrouvons en maléate simple 665.10^5 particules lytiques, soit 97 p. 100 du phage introduit.

Dans le liquide surnageant, après fixation du phage sur les bactéries, on retrouve seulement 7.10^5 particules. Etant donné la remarquable conservation du phage libre dans le maléate de $\text{Sr } 10^{-1} \text{ M}$, on peut conclure que 96 p. 100 des phages doivent s'être fixés sur les bactéries sensibles. Or, lorsqu'on dénombre les centres infectieux formés par les bactéries infectées séparées du phage non fixé, on trouve seulement 185.10^5 centres infectieux, soit 27,8 p. 100 du phage libre survivant à la fin de l'expérience. La suspension de bactéries infectées non séparées du phage non fixé donne naissance à 204.10^5 centres infectieux, soit 30,6 p. 100 du phage libre survivant.

Etant donné l'excellente conservation du phage libre dans le maléate étudié, nous devons admettre que 70 p. 100, environ, des bactéries infectées n'ont pu donner naissance à des centres infectieux. Ceci nous a amenés à calculer le pourcentage de phage fixé, par rapport au phage total survivant à la fin de l'expérience dans une portion de la sus-

pension de bactéries infectées, non centrifugées. Dans le cas présent, le pourcentage de phage fixé est alors de 94 p. 100, ce qui concorde mieux avec le faible pourcentage de phage non fixé enregistré.

Les raisons pour lesquelles une partie importante des F6S infectés de H-SHPB(Ca) en infection unique, en maléate de Sr, se montrent incapables de former un centre infectieux ne sont pas claires. Le strontium paraît avoir une certaine toxicité pour F6S, mais elle ne se manifeste pas de façon assez intense ni assez régulière pour expliquer la diminution des centres infectieux uniquement par la mort des bactéries sensibles. En effet, le nombre de colonies formées par une culture de F6S après centrifugation et mise en suspension dans du maléate de Sr 0,4 M, n'est que de 27 p. 100 inférieur au nombre de colonies formées par la culture en milieu LB.

Les faits que nous venons de décrire s'observent également en maléates de NH_4 , K et Na, mais à un degré moindre. Ils n'ont pas été observés en maléates de Ba ou de Mg. Cette anomalie n'a pas été observée non plus lors de l'étude de la fixation de H-SHPB(Ca) sur les bactéries R, elle paraît liée au caractère S de la souche F6S.

2° ACTION DU SÉRUM ANTI-H-SHPB(Ca) SUR LE PHAGE H-SHPB(Ca) FIXÉ SUR F6S EN ABSENCE DE CALCIUM. — L'action neutralisante exercée par le sérum anti-H-SHPB(Ca) sur le phage H-SHPB(Ca) fixé en absence de Ca^{++} est une action spécifique, puisque le sérum normal de lapin est inactif à cet égard. Nous pensons pouvoir affirmer que cette action est celle des anticorps anti-phages pour les raisons suivantes :

a) Toutes les expériences ont été réalisées avec du sérum anti-phage débarrassé des anticorps anti-bactériens par contacts répétés avec SHPB.

b) Les sérums anti-SHPB et anti-F6S vivants sont incapables d'empêcher la formation des centres infectieux lorsqu'on les fait agir sur F6S infecté de H-SHPB(Ca) en absence de Ca^{++} . Il ne s'agit donc pas ici d'un fait analogue à celui décrit par Quersin-Thiry [6] pour le coli ϕ S et le phage PF, dont la libération peut être bloquée par le sérum anti- ϕ S agissant après la fixation du phage. Ajoutons que F6S ne possède pas d'antigène de surface ; or, ces antigènes paraissent jouer un rôle essentiel dans les faits décrits par cet auteur.

Lorsque la fixation de H-SHPB(Ca) sur F6S est réalisée dans les maléates de Na, K, NH_4 , Mg ou Ba, moins de 5 p. 100 des phages fixés échappent à l'action neutralisante du sérum anti-H-SHPB(Ca). Par contre, en maléate de Sr, cette proportion est

plus élevée mais les résultats sont assez irréguliers. En effet, suivant les expériences, 10 à 30 p. 100 des phages fixés échappent à la neutralisation spécifique.

Seuls les ions Ca^{++} permettent donc au phage H-SHPB(Ca) fixé sur F6S d'échapper en totalité à la neutralisation par le sérum anti-H-SHPB(Ca). Cette spécificité suggère qu'ils agiraient ici en accélérant une réaction enzymatique dont la conséquence serait l'élimination de l'obstacle constitué par l'antigène S de F6S [7].

L'état physiologique des bactéries F6S, au moment de l'infection par H-SHPB(Ca), ne paraît pas influencer la sensibilité aux anticorps du phage fixé sur F6S, tout au moins dans les limites où nous l'avons fait varier.

Nous avons fait agir le sérum anti-phage sur des suspensions en maléate de Na, 0,4 M en Na^+ , de F6S infecté de H-SHPB(Ca), préparées au moyen de cultures âgées de 2 heures, de 24 heures ou de 24 heures ayant, de plus, avant l'infection, séjourné 2 heures à 37° C en solution physiologique. Dans tous les cas, plus de 95 p. 100 des phages fixés sont neutralisés par le sérum.

Lorsqu'on élève le rapport phage/bactérie, jusqu'à introduire dans la suspension de F6S en maléate de Na, 0,4 M en Na^+ , 7 à 10 phages par bactérie, la proportion de bactéries infectées qui forment un centre infectieux après avoir été exposées à l'action du sérum anti-H-SHPB(Ca) s'élève quelque peu. Suivant les expériences, 7 à 25 p. 100 des bactéries infectées forment un centre infectieux, mais il n'est pas certain que ce soit le résultat de la multiplicité d'infection, car le phage a été introduit sans dilution préalable, entraînant une petite quantité de Ca^{++} . Nous verrons plus loin que de petites quantités de Ca^{++} peuvent avoir cet effet.

3° RÔLE DU CALCIUM DANS LA PÉNÉTRATION DE H-SHPB(Ca) DANS F6S. — a) Afin de vérifier si le calcium est spécifiquement nécessaire à la pénétration du phage, nous avons réalisé l'infection de F6S par H-SHPB(Ca) dans les conditions habituelles, simultanément en maléate de Na, 0,4 M en Na^+ , et en maléate de Na, à la même concentration, additionné de quantités de Ca^{++} insuffisantes, par elles-mêmes, pour permettre la fixation ; les concentrations finales en Ca^{++} étaient respectivement de 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} et 10^{-6} M.

En maléate de Na ($\text{Na}^+ = 0,4$ M) + $\text{Ca}^{++} 10^{-3}$ M, la totalité des phages fixés échappent à l'action neutralisante du sérum anti-H-SHPB(Ca), en maléate de Na ($\text{Na}^+ = 0,4$ M) + $\text{Ca}^{++} 10^{-4}$ M, 50 à 80 p. 100, suivant les expériences, des phages fixés y échappent. Aux concentrations inférieures à 10^{-4} M en Ca^{++} et

dans les témoins sans Ca^{++} , plus de 90 p. 100 des phages fixés sont neutralisés. Lorsque la fixation est le fait des ions Mg^{++} , il semble que le calcium soit un peu moins efficace : en maléate de Mg 0,4 M + Ca^{++} 10^{-3} M, 60 p. 100 seulement des phages fixés échappent à la neutralisation par le sérum. Nous avons vu que, lorsque la fixation est réalisée en maléate de Sr , le pourcentage des phages fixés non neutralisables est relativement élevé. Néanmoins, pour augmenter la proportion de phages fixés non neutralisables, des quantités de Ca^{++} extrêmement élevées sont nécessaires. Une concentration de 10^{-3} M en Ca^{++} , suffisante, à elle seule, à assurer la fixation et la pénétration du phage dans F6S, est inefficace pour assurer la pénétration du phage en présence de Sr^{++} 0,4 M. En maléate de Sr 0,4 M + Ca^{++} 10^{-1} M, 80 p. 100 des phages fixés échappent à l'action du sérum et ce n'est qu'en présence de concentrations équimoléculaires de Sr^{++} et de Ca^{++} (Sr^{++} 0,2 M + Ca^{++} 0,2 M) que la totalité des phages fixés échappent à la neutralisation spécifique. *A fortiori*, le Sr ou le Mg , ajoutés en petites quantités au maléate de Na 0,4 M en Na^+ , ne peuvent remplacer le Ca pour assurer la pénétration de H-SHPB(Ca) dans F6S.

b) Hershey et Chase [8] arrachant, par agitation au Waring-blendor, les enveloppes protéiques du phage T2, fixé sur des bactéries sensibles, ont montré que seul l'ADN du phage pénètre dans la bactérie hôte et y assure la reproduction de nouvelles particules infectantes. Par contre, Théry-Lanni [9] a montré que le même traitement, appliqué à *E. coli* B peu après l'infection par le phage T5 qui est un phage à injection lente, a pour effet de supprimer les centres infectieux, le matériel nécessaire à la reproduction du phage n'ayant pas encore complètement pénétré dans les cellules hôtes au moment où les phages en sont arrachés. Nous avons donc appliqué le même traitement à F6S infecté de H-SHPB(Ca) en milieu calcifié ou non, afin de vérifier si la pénétration du phage est effectivement ralentie en absence de Ca .

Les expériences ont été réalisées de la manière suivante :

Des suspensions de F6S infecté de H-SHPB(Ca), débarrassé du phage non fixé par centrifugation, sont préparées de la manière habituelle en maléate de Na , 0,4 M en Na^+ , d'une part, et dans ce maléate additionné de Ca^{++} 10^{-3} M, d'autre part. Ces suspensions sont immédiatement diluées au 1/100 dans le milieu correspondant glacé, puis une portion de chacune d'elles est exposée à l'action du sérum anti-phage, tandis que les portions restantes sont passées au Waring-blendor durant une minute à grande vitesse. Des titrages du phage sont effectués au moment de l'infection, puis dans les suspensions infectées diluées, immédiatement avant et immédiatement après passage au Waring-blendor ou exposition à la neutralisation par le sérum anti-H-SHPB(Ca).

Voici les résultats d'une expérience de ce type : 70 p. 100 des bactéries infectées en maléate de Na, 0,4 M en $\text{Na}^+ + \text{Ca}^{++}$ 10^{-3} M forment un centre infectieux après action du sérum anti-phage et 68 p. 100 après passage au Waring-blendor. Par contre, en maléate de Na, 0,4 M en Na^+ , il n'y a plus que 1,8 p. 100 des bactéries infectées exposées à l'action du sérum et 0,6 p. 100 de celles qui ont été soumises à l'agitation au Waring-blendor qui forment un centre infectieux.

L'agitation durant une minute au Waring-blendor dans les milieux utilisés étant sans effet sur la vitalité de F6S, nous pensons pouvoir conclure de ces expériences que chez plus de 99 p. 100 des bactéries F6S, infectées de H-SHPB(Ca) en maléate de Na, la pénétration de tout le matériel nécessaire à la reproduction du phage n'a pas encore eu lieu, tandis qu'en maléate calcifié, ce transfert s'est déjà effectué, chez 70 p. 100 des bactéries infectées, immédiatement après la fixation.

Des expériences de croissance à cycle unique, réalisées en milieu non calcifié et combinées au traitement par le sérum anti-H-SHPB(Ca) ou au passage au Waring-blendor, dont le détail sera publié ultérieurement, montrent que ce n'est qu'au cours du dernier quart de la période de latence que les bactéries F6S, infectées en absence de Ca^{++} , se révèlent capables de former des centres infectieux après passage au Waring-blendor ou exposition au sérum anti-H-SHPB(Ca). Ces faits nous paraissent indiquer clairement qu'en absence de Ca^{++} , le phage H-SHPB(Ca) n'injecte que très difficilement dans F6S le matériel nécessaire à y assurer la reproduction et la libération de particules de phage mûres.

4° FIXATION DE H-SHPB(Ca) SUR LA SOUCHE F263. — S'il est exact qu'un antigène caractéristique de la forme S fait obstacle à la fixation puis à la pénétration du phage H-SHPB(Ca) dans F6S, la fixation sur une autre souche S sensible doit présenter les mêmes anomalies que la fixation sur F6S.

Effectivement, la fixation sur F263 n'a pas lieu aux concentrations en Na^+ inférieures à 0,4 M, et, à cette concentration, la proportion de phage fixé ne dépasse pas 50 p. 100 du phage total survivant. Plus de 95 p. 100 des phages ainsi fixés sont neutralisés par le sérum anti-H-SHPB(Ca). L'addition de Ca^{++} 10^{-4} M au maléate de Na suffit à permettre au phage fixé sur F263 d'échapper à la neutralisation spécifique.

L'électrophorèse de F263, réalisée en maléate de Na $2 \cdot 10^{-2}$ M, nous a montré que le potentiel ζ négatif de cette souche est très voisin de celui de F6S qui, rappelons-le, est approximativement la moitié du potentiel ζ des souches R. Ceci montre, étant donné les fortes concentrations en ions Na^+ exigées pour la fixation

du phage, que, chez F263 comme chez F6S, un obstacle autre que la barrière de potentiel s'oppose à la fixation du phage. La pénétration est gênée également, ainsi que le montre la sensibilité aux anticorps anti-phages de H-SHPB(Ca) fixé sur F263 en maléate de Na.

L'addition de Ca^{++} , 10^{-4} M, au maléate de Na, 0,4 M en Na^+ , suffit pour que la totalité du phage fixé sur F263 échappe à l'action neutralisante des anticorps anti-H-SHPB(Ca), tandis que, dans le même milieu, 50 à 80 p. 100 seulement des phages fixés sur F6S y échappent. A concentration égale en Ca^{++} , la pénétration de H-SHPB(Ca) serait donc plus rapide dans F263 que dans F6S. S'il est exact qu'un enzyme intervient pour permettre le passage au-delà des antigènes S de F263 et de F6S, il n'est pas étonnant d'observer des différences d'activité suivant que le substrat qui lui est présenté est constitué par les antigènes S de F263 ou de F6S, car ces deux germes, quoique ayant des antigènes de groupe communs, ont un antigène type spécifique différent.

Enfin, la fixation de H-SHPB(Ca) sur la forme R de F263 s'opère en maléate de Na à de plus faibles concentrations cationiques que sur la forme S et elle est inhibée aux concentrations élevées en Na^+ nécessaires pour permettre la fixation sur la forme S, comme cela a été observé avec F6S et F6R.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

Les conditions dans lesquelles le phage H-SHPB(Ca) fixé sur F6S demeure neutralisable par le sérum anti-phage ont été définies.

Des expériences de fixation, combinées à l'action du sérum anti-phage et à l'agitation au Waring-blendor, ont montré qu'en absence de Ca, l'injection dans F6S du matériel nécessaire à la reproduction du phage est ralentie, que ce ralentissement est spécifiquement levé par l'addition, au milieu de fixation, de quantités de Ca insuffisantes, à elles seules, à permettre la fixation, et, enfin, que la sensibilité du phage fixé à la neutralisation par le sérum spécifique évolue parallèlement à l'inhibition de la pénétration du matériel phagique dans la bactérie hôte. Luria et Steiner [10] ont montré que le calcium est indispensable à la pénétration du phage T5 dans *E. coli* B, mais, contrairement à ce que nous avons observé pour H-SHPB(Ca) et F6S, le sérum anti-phage n'est pas capable de neutraliser T5 fixé, bien que la formation de centres infectieux soit supprimée par le passage au Waring-blendor. Enfin, dans les expériences de Luria et Steiner, le Mg et le Sr peuvent remplacer le Ca pour assurer

la pénétration de T5 dans le coli B, alors que le Ca est seul capable d'accélérer celle de H-SHPB(Ca) dans F6S.

Le fait que la fixation de H-SHPB(Ca) en absence de Ca^{++} sur une autre souche S sensible, F263, présente les mêmes anomalies que la fixation sur F6S, en ce qui concerne la forte concentration cationique à laquelle elle se produit et la sensibilité du phage fixé à la neutralisation par le sérum spécifique, renforce l'hypothèse selon laquelle l'antigène S constituerait un obstacle à la fixation et à la pénétration du phage dans la bactérie hôte.

Nous avons vu qu'une concentration équimoléculaire de Ca est nécessaire pour assurer la pénétration du phage dans F6S lorsque la fixation a lieu en maléate de Sr. Ce fait est cohérent avec l'hypothèse selon laquelle une réaction enzymatique, dont le Ca serait le cofacteur spécifique, est nécessaire pour permettre au phage de franchir l'obstacle constitué par l'antigène S de F6S. Le Sr, en se substituant au Ca, bloquerait cette réaction. C'est probablement ce blocage enzymatique qui est responsable de la disparition de 70 p. 100 des centres infectieux, observée dans les suspensions de F6S infectées de H-SHPB(Ca) en maléate de Sr. Cette situation est très semblable à celle décrite par Gross [11] pour le coli K12 soumis au jeûne, puis infecté par le phage T2rl. En effet, dans ce cas, 60 p. 100 des bactéries infectées se révèlent incapables de former un centre infectieux, et, chez les autres, on observe la neutralisation du phage fixé par le sérum anti-phage.

Signalons enfin que les suspensions de phage H-SHPB(Ca) concentrées (10^{11} à 10^{12} phages/ml) possèdent une faible activité lytique vis-à-vis des suspensions de germes sensibles irradiés à l'U.-V. Cette activité est toutefois indépendante de la concentration en ions Ca^{++} du milieu.

De l'ensemble des faits exposés, nous pensons pouvoir conclure que la sensibilité au sérum anti-phage du phage H-SHPB(Ca) fixé sur F6S, en l'absence de Ca, est la conséquence de la lenteur de pénétration chez ce germe, dans ces conditions cationiques particulières, du matériel nécessaire à la reproduction du phage, mais le mécanisme intime de l'action des anticorps sur le phage ainsi fixé reste à élucider.

SUMMARY

EFFECT OF CALCIUM ON PHAGE PENETRATION INTO CERTAIN SENSITIVE BACTERIA.

The adsorption of phage H-SHPB(Ca) on the sensitive bacteria may occur in media (maleates of various cations) which do not contain Ca^{++} . In this case, but only when the sensitive bacteria are in the S form, the adsorbed phage remains neutralizable

by the antiphage antibodies and can be detached by shaking in a Waring blender.

The addition to the adsorption medium of amounts of Ca^{++} (10^{-3} M) insufficient by themselves to allow the adsorption of the phage onto the sensitive bacteria, permits the rapid penetration of the phage material into the sensitive bacteria as judged by insensitivity to the antibodies as well as to blending. Mg^{++} and Sr^{++} cannot replace Ca^{++} .

It seems likewise that the S antigen of the sensitive bacteria constitutes a barrier between the phage and its receptor. Some facts suggest that an enzymic reaction, catalyzed by Ca^{++} , would be implied in the phage penetration through the S antigen to the receptor.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BEUMER (J.) et BEUMER-JOCHMANS (M.-P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1955, **89**, 394.
 - [2] BEUMER (J.), BEUMER-JOCHMANS (M.-P.) et DIRKX (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1956, **91**, 397.
 - [3] BEUMER (J.), BEUMER-JOCHMANS (M.-P.) et DIRKX (J.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **93**, 36.
 - [4] DIRKX (J.), BEUMER (J.) et BEUMER-JOCHMANS (M.-P.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1957, **93**, 168.
 - [5] BERTANI (G.). *J. Bact.*, 1951, **62**, 293.
 - [6] QUERSIN-THIRY (L.). *Supplément à la Rev. belge Path. Méd. expér.*, 1956.
 - [7] BROWN (D. D.) et KOZLOFF (L. M.). *J. biol. Chem.*, 1957, **225**, 1.
 - [8] HERSHEY (A. D.) et CHASE (N.). *J. gen. Physiol.*, 1952, **36**, 39.
 - [9] THERY-LANNI (Y.). *J. Bact.*, 1954, **67**, 640.
 - [10] LURIA (S. E.) et STEINER (D. L.). *J. Bact.*, 1954, **67**, 635.
 - [11] GROSS (S. R.). *J. Bact.*, 1954, **68**, 36.
-

SOLUBILISATION DE PHOSPHATES NATURELS PAR LES GERMES DU SOL

par A. ROCHE et H. de BARJAC (*).

(Institut Pasteur, Service de Microbiologie du Sol)

Ayant montré que des terres carencées en P, mais enrichies en phosphates naturels insolubles, avaient une activité biologique globale accrue par rapport à des terres non enrichies, nous avons pensé que cette stimulation supposait l'utilisation des phosphates par divers microorganismes. Nous avons alors cherché une preuve directe de l'utilisation des phosphates naturels par les germes telluriques. Pour ce, nous avons essayé de mettre en évidence la dissolution des phosphates par des cultures microbiennes.

Notre étude porte sur une terre d'indice Morgan très faible et sur une terre riche de jardin ; cette dernière non carencée en P nous sert de témoin. En effet, si la carence en P des sols est bien reliée à leurs propriétés microbiologiques, il pourrait y intervenir des déficiences en microorganismes solubilisant et rendant valables les réserves minérales. Il apparaît donc indispensable de rechercher les microorganismes phospho-dissolvants à la fois sur une terre carencée en P et sur une terre non carencée.

Avant toute étude, les deux terres ont été enrichies en phosphates insolubles d'origine d'Afrique du Nord (Gafsa), c'est-à-dire ont été mises en incubation à 28° C durant huit jours, en présence de 5 p. 100 de phosphate et 20 p. 100 d'eau distillée stérile.

TECHNIQUES.

Nous avons essayé de mettre en évidence ce phénomène de phospho-solubilisation de deux façons : l'une macroscopique, l'autre microscopique, en faisant varier dans les deux cas la richesse en éléments nutritifs des milieux de culture et d'isolement des germes recherchés. Les premiers essais ont porté sur des milieux pauvres ne renfermant uniquement que des sels minéraux et de l'extrait de terre.

(*) *Société Française de Microbiologie*, séance du 8 janvier 1959.

C'est un milieu de base composé de : SO_4Mg , 2,5 g ; ClNa , 2,5 g ; $(\text{SO}_4)_3\text{Fe}_2$, 0,05 g ; NO_3NH_4 , 2 g ; extrait de terre, 50 ml ; eau de puits, 1 000 ml. Les autres essais ont porté sur ce milieu de base, mais enrichi soit en glucose 0,5 p. 100, asparagine 0,5 p. 100, soit en mannitol 0,5 p. 100, asparagine 0,5 p. 100.



FIG. 1.

Pour la mise en évidence *macroscopique*, le principe est basé sur la recherche de zones de solubilisation visibles à l'œil nu, en milieu phosphaté ensemencé par la microflore totale. Quant à la technique, l'ensemencement est réalisé soit dans la masse du milieu gélosé par des suspensions-dilutions de sol, soit en surface dans le cas des silico-gels par des grains de terre. Le phosphate (3 ml par boîte d'une suspension à 10 p. 100) est ajouté aux milieux gélosés, préalablement ramenés à 50° C ; pour les silico-gels, les boîtes sont imprégnées du milieu de base, puis

émaillées de phosphate. En milieu gélosé, la dissolution des particules de phosphate finement dispersées dans la masse se marque par un halo clair autour des colonies actives. En silico-gel, cette dissolution apparaît comme des auréoles dans l'émaillage autour de certains grains de terre.

Pour la mise en évidence *microscopique*, nous avons procédé

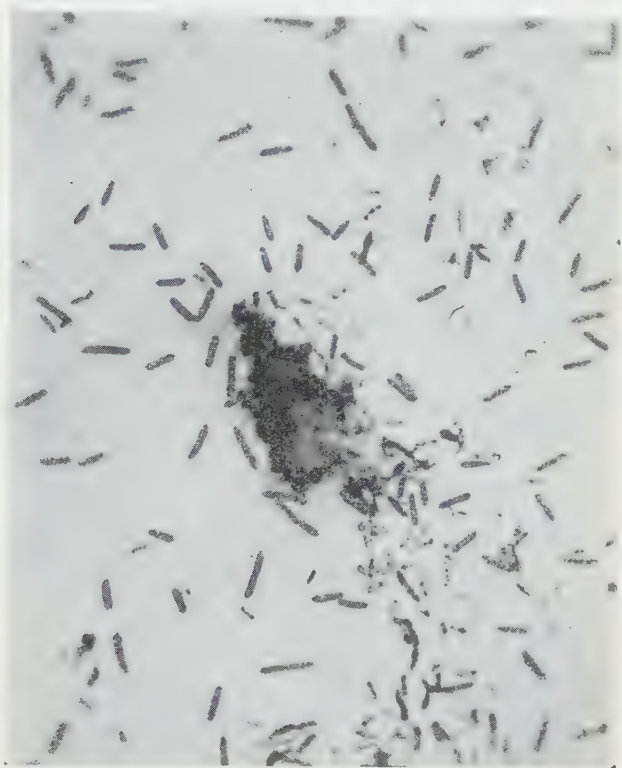


FIG. 2.

à des essais sur lames à film gélosé-phosphaté dans le but d'étudier le comportement des microorganismes telluriques vis-à-vis des cristaux de phosphates naturels. Le nombre des examens permet de mieux saisir l'aspect évolutif du processus de dissolution. Ainsi, pendant vingt jours, nous avons suivi régulièrement le développement et l'action des germes au contact de particules de phosphate. Le milieu de base gélosé, enrichi ou non, ramené à 50° C est inoculé au moyen d'une suspension-dilution de sol, additionnée d'une suspension de phosphate, coulé sur lames

stériles et incubé en chambre humide à 28° C. Chaque jour, après coloration à l'érythrosine phéniquée, une lame est examinée au microscope.

RÉSULTATS.

ESSAI DE DÉMONSTRATION MACROSCOPIQUE. — Les analyses qui ont porté sur le milieu de base gélosé n'ont montré aucune zone

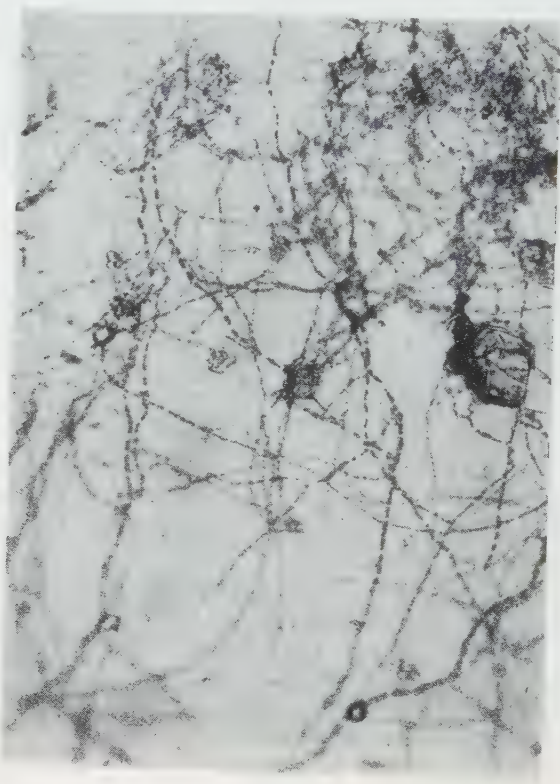


FIG. 3.

de phospho-dissolution décelable après trente jours d'incubation à 28° C.

Dans le cas des boîtes de silico-gel des différences sont à noter, selon que les expériences ont été faites avec la terre carencée en P ou la terre riche de jardin. La terre carencée ne montre aucune zone de dissolution autour des grains de terre. Par contre, après un mois d'incubation, la terre de jardin laisse apparaître de très légères zones dissoutes autour des colonies se dévelop-

pant à partir de quelques grains de terre. Ces zones sont très petites et leur apparition lente indique la faiblesse du processus. Cependant l'isolement des germes responsables a été effectué. Ces expériences, peu démonstratives, nous ont incités à les refaire en enrichissant le milieu de culture en glucose-asparagine ou en mannitol-asparagine.

En milieu gélosé, des résultats positifs sont alors obtenus aussi

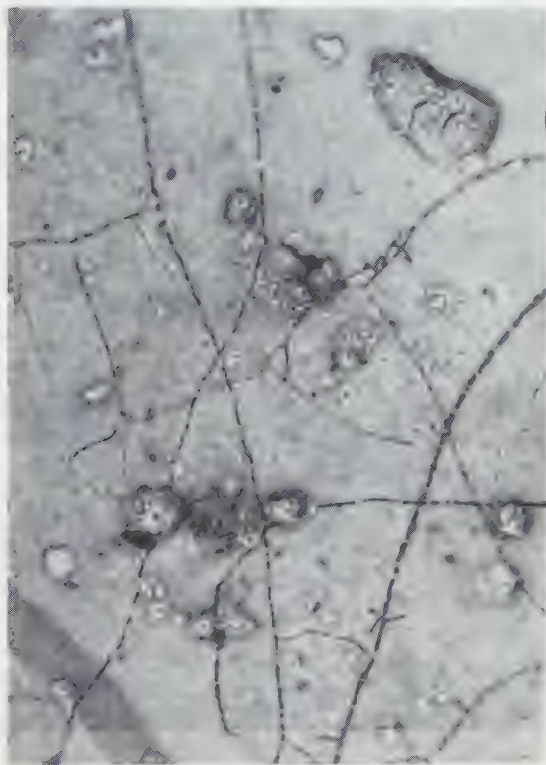


FIG. 4.

bien avec la terre carencée qu'avec la terre riche, mais seulement sur le milieu glucose-asparagine. Les colonies se présentent entourées d'une zone de dissolution du phosphate de 1 à 3 mm de diamètre ; elles ont donné lieu à l'obtention de souches pures dont nous poursuivons l'étude. Ces zones sont visibles assez vite, après huit à dix jours d'incubation ; au bout d'un mois aucune zone nouvelle n'apparaît. En milieu mannitol-asparagine, les résultats sont négatifs.

Après l'étude des boîtes de gélose, nos expériences ont porté sur des plaques de silico-gel imprégnées par l'une ou l'autre des solutions suivantes, soit : NO_3NH_4 , 0,5 g ; glucose, 0,5 g ; asparagine, 0,5 g ; extrait de terre, 50 ml ; soit : NO_3NH_4 , 0,5 g ; asparagine, 1 g ; eau de levure, 10 ml ; extrait de terre, 40 ml.

Après quatre jours d'incubation, certains grains de terre pré-

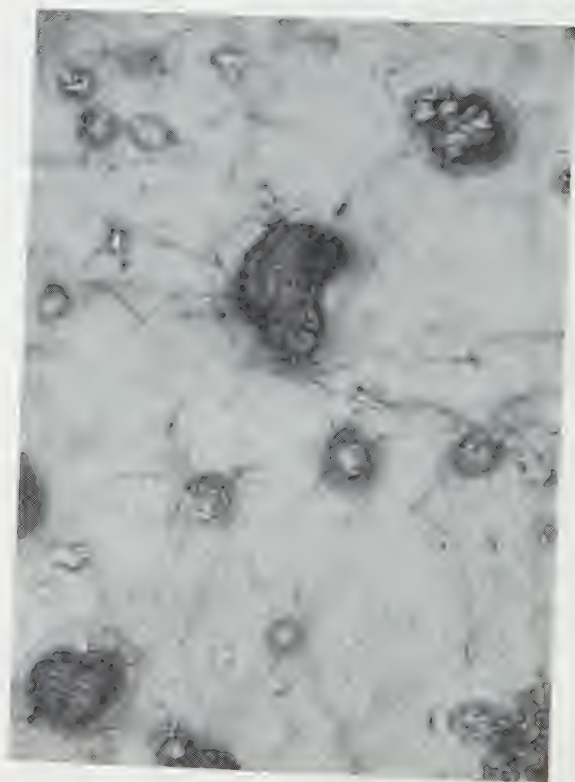


FIG. 5.

sentent une prolifération de grosses colonies solubilisant le phosphate. Les colonies développées sont toutes du même type : elles apparaissent comme de grosses gouttes de mucus, transparentes, visqueuses. Ces colonies sont apparentes sur la figure 1 montrant les grains de terre auréolés de zones blanches de dissolution sur le fond gris noir formé par le phosphate insoluble. La figure 2 montre les germes en cause ; ce sont, en dominance, de gros bacilles parfois incurvés, à extrémités amincies. Par contre, si la terre riche donne également lieu à l'apparition de telles zones

claires, celles-ci ne se développent que tardivement. Dans les deux cas, les colonies ont été prélevées, isolées, et ont donné lieu à l'obtention de souches pures.

ESSAI DE MISE EN ÉVIDENCE MICROSCOPIQUE. — Quand le milieu de culture employé est celui dit de base, les résultats diffèrent

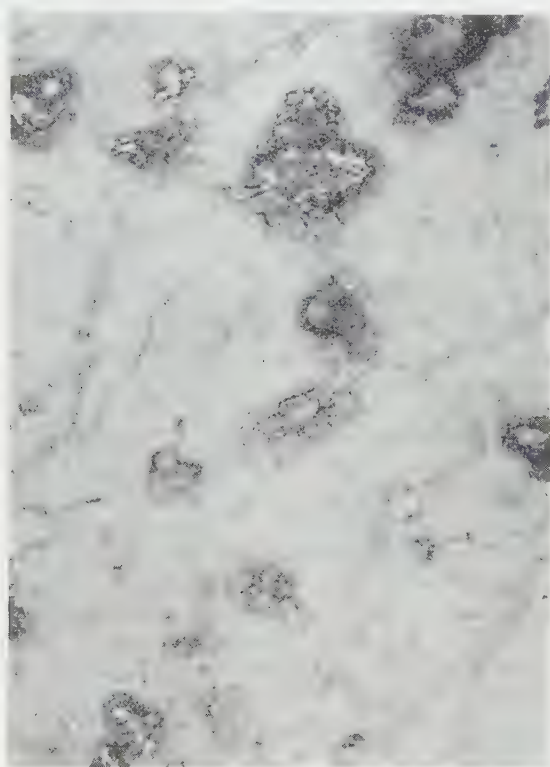


FIG. 6.

selon qu'il s'agit de la terre carencée ou de la terre riche de jardin.

Dans le cas de la terre carencée, l'on assiste à un développement de Champignons et d'Actinomycètes du type des *Micromonospora* et des *Streptomyces*. L'attaque des cristaux ne commence que vers le dixième jour d'incubation et n'est surtout sensible qu'au quinzième jour. Les figures 3 et 4 montrent les hyphes des Actinomycètes qui entourent les cristaux de phosphate.

Dans le cas de la terre de jardin, on voit, à l'inverse du cas

précédent, une prolifération non seulement fongique, mais également bactérienne.

Sur milieu enrichi au glucose-asparagine, dans le cas des deux terres il se produit un développement intense et envahissant de Champignons. Il s'agit essentiellement d'*Aspergillus* et de *Penicillium*; simultanément se développent des Actinomycètes. Sur milieu enrichi au mannitol-asparagine, la terre carencée donne lieu à une culture dominante d'Actinomycètes dont les hyphes pénètrent les cristaux de phosphates insolubles dont les contours deviennent flous, ce qui est visible sur les figures 5 et 6. La terre riche favorise le développement bactérien.

CONCLUSIONS.

Ces deux techniques, l'une macroscopique, l'autre microscopique, permettent de mettre en évidence l'existence d'une phospho-solubilisation par les germes telluriques. Ce phénomène est l'apanage de deux terres différentes : l'une carencée en P, l'autre riche, mais cette mise en évidence ne se manifeste que dans des conditions de culture bien définies. Il faut, pour que le processus apparaisse, fournir aux microorganismes des milieux assez riches additionnés de glucose et d'asparagine. Des milieux de ce type, enrichis en diverses substances organiques et spécialement en glucose, ont déjà été utilisés par différents auteurs (Pikowskaia. 1948 [1]; Mouromtsev, 1955-1957 [2]; Sperber, 1957 [3]). pour démontrer la présence de germes phospho-dissolvants. La nécessité du glucose est en faveur de la théorie de solubilisation par l'acidité, mais ceci appartient au problème du mécanisme de solubilisation, problème que nous n'envisagerons pas ici. Enfin, non seulement il existe des bactéries douées du pouvoir solubilisant, mais également des Actinomycètes et des Champignons, comme l'avaient déjà signalé Gerretsen (1949) [4], Mouromtsev (1955) [2], Sperber (1957) [3].

Les bactéries ont pu être isolées des zones de solubilisation. Leur isolement, leur étude avec leurs caractères biochimiques feront l'objet d'une prochaine note.

RÉSUMÉ.

A l'aide de deux techniques, macroscopique et microscopique, nous avons mis en évidence le phénomène de solubilisation des phosphates naturels sous l'action de germes du sol. Ce phénomène se produit aussi bien avec une terre P carencée qu'avec une terre riche, mais il est surtout net en présence de substances organiques, spécialement asparagine et glucose.

SUMMARY

SOLUBILIZATION OF NATURAL PHOSPHATES BY TELLURIC GERMS.

This solubilization has been demonstrated by means of a macroscopical and a microscopical technique. The phenomenon is realized with a P-deficient as well as with a P-rich soil, but is particularly marked in presence of organic substances, especially asparagin and glucose.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] PIKOWSKAIA (R. I.). *Microbiologia*, 1948, **17**, 5.
 - [2] MOUROMTSEV (G. S.). *Dokladi Vashnil*, 1955, **5**, 35 ; *Microbiologia*, 1957, **26**, 172.
 - [3] SPERBER (J. I.). *Nature*, 1957, **187**, 994.
 - [4] GERRETSEN (F. C.). *Plant and Soil*, 1949, **1**, 51.
-

SOCIÉTÉ FRANÇAISE DE MICROBIOLOGIE

(Institut Pasteur, 25, rue du Docteur-Roux, Paris, 15^e)

Séance du 17 avril 1959.

Présidence de M. PRÉVOT.

COMMUNICATION

ÉTUDE COMPARATIVE SUR DES SOUCHES D'*ESCHERICHIA FREUNDII* ET DES SOUCHES DE *SALMONELLA*

par S. SCHÄFLER et Catalina SCHÄFLER.

(Institut Cantacuzène, Bucarest)

Nous avons essayé d'établir dans quelle mesure les méthodes utilisées par nous [4] pour caractériser des souches d'*E. freundii*, pouvaient servir pour mettre en évidence d'éventuelles relations entre *E. freundii* et les *Salmonella* (fermentation des glucides et des glucosides, étude des fermentations primaires et mutatives, utilisation de certaines substances organiques comme unique source de carbone, etc.).

Les 83 souches d'*E. freundii* ont été décrites dans une note antérieure [4].

Nous avons étudié, en outre, 83 souches de *Salmonella* appartenant aux groupes sérologiques A (1), B (21), C₁ (11), C₂ (13), D (10), E₁ (5), E₂ (3), E₃ (1), E₄ (3), F (2), G (2), H (2) et I (2), ainsi que 7 souches faisant partie d'autres groupes sérologiques.

RÉSULTATS. — Les données concernant la fermentation du cellobiose, de l'arbutine, de la salicine, du raffinose, du sorbose et du D-arabinose, sont représentées dans la figure 1.

La comparaison des valeurs de la figure 1 donne l'impression que le processus de la diminution de l'activité fermentative observée chez les souches d'*E. freundii* à antigène Vi est plus accentué chez les *Salmonella*.

La fermentation du cellobiose a été observée chez 79 souches et chez la majorité des souches, dans l'espace de trois à six jours. Cette fermentation est mutative et très intense. L'arbutine est fermentée

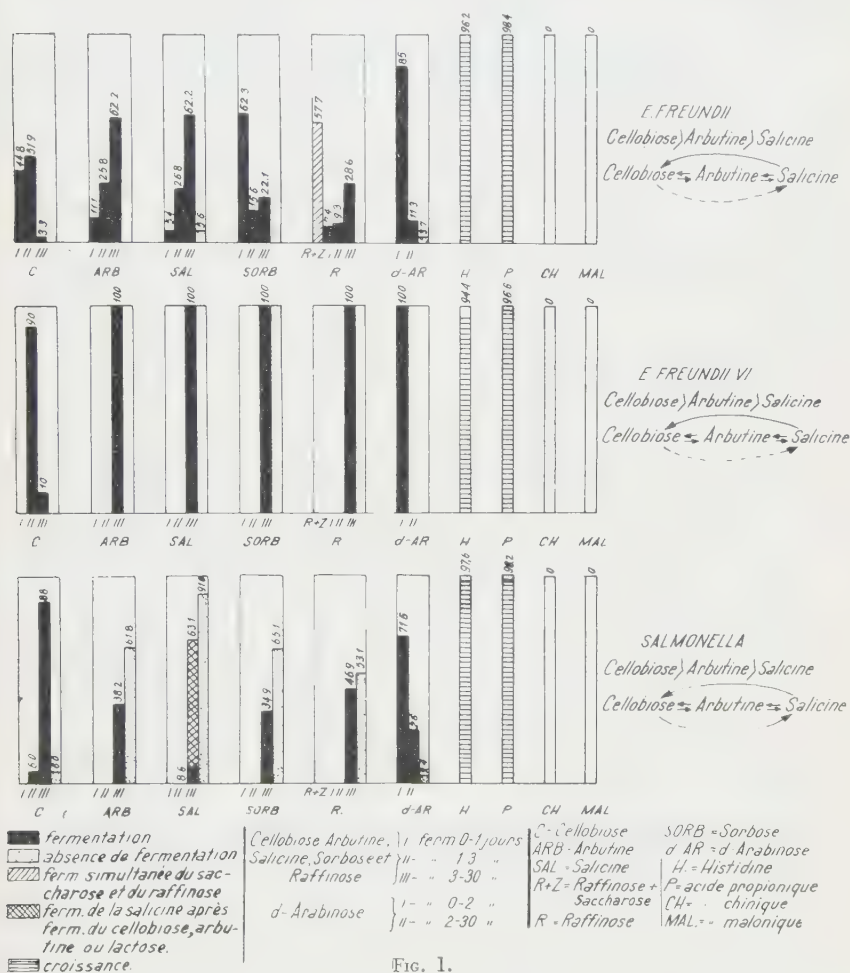


FIG. 1.

de manière mutative par 31 souches et la salicine par 9 souches, la fermentation de ces deux glucosides étant beaucoup plus faible.

Comme dans le cas d'*E. freundii*, la fermentation de la salicine et de l'arbutine, est accompagnée par la fermentation rapide (vingt-quatre heures) du cellobiose. Nous avons obtenu la fermentation de la salicine (en huit à trente jours) chez 41 souches, après deux passages sur les milieux à cellobiose.

Par une incubation prolongée en milieu à salicine, nous avons

obtenu des variantes qui attaquent de manière plus intense la salicine et le cellobiose.

Le raffinose a été fermenté par 3 souches dans le milieu en eau peptonée, et par 31 souches dans le milieu de Koser à 0,2 p. 100 de peptone. L'incubation préalable en milieu à mélibiose accélère, chez certaines souches, la fermentation ultérieure du raffinose. La fermentation du raffinose est mutative et n'est pas accompagnée par la fermentation du saccharose. La scission du raffinose se produit donc au niveau de la liaison α -galactosidique.

Le sorbose est fermenté de manière mutative par 29 souches (sept à trente jours), les variantes se comportant de la même façon que les variantes sorbose-positives d'*E. freundii* à antigène Vi.

Le D-arabinose est fermenté de manière mutative par presque toutes les souches de *Salmonella*. Chez 3 souches, on a constaté la fermentation primaire du D-arabinose. Les variantes sont faciles à obtenir sous forme de colonies-filles sur milieu Koser peptoné et gélosé à 2 p. 100.

L'utilisation des acides aminés, des nucléosides et des acides organiques comme unique source de carbone est identique chez les *Salmonella* et dans le groupe *E. freundii*.

Chez certaines souches lactose-négatives d'*E. freundii*, nous avons observé un rapport entre la fermentation mutative du lactose et l'apparition d'une fermentation primaire intense des glucides à liaison β -glucosidique. D'autre part, Kristensen [2, 3] a constaté la fermentation de la salicine par certaines variantes lactose-positives de *Salmonella*. C'est pourquoi nous avons étudié 18 variantes lactose-positives de *Salmonella*, dont une obtenue du Dr Kristensen, en ce qui concerne le rapport entre la fermentation du lactose et celle des glucides à liaison β -glucosidique.

Les variantes lactose-positives ont été obtenues par incubation de trente-deux à cent cinquante jours dans le milieu de Koser (50 ml de milieu à 0,2 p. 100 peptone et 1 p. 100 lactose), variantes qui ont été ensuite isolées sur le même milieu additionné de gélose 2 p. 100.

Les résultats de l'étude des variantes lactose-positives, sont donnés dans le tableau I.

De ce tableau il résulte que toutes les variantes acquièrent la propriété d'attaquer rapidement (de manière primaire) le cellobiose, trait distinctif de la majorité des souches lactose-positives d'*E. freundii*. Certaines de ces variantes de *Salmonella* possèdent, en outre, la capacité de fermenter l'arbutine et la salicine.

Les variantes ne subissent pas de modifications de structure antigénique ou d'autres caractères biochimiques.

Ces résultats montrent l'identité de plusieurs réactions fermentatives des *Salmonella* et d'*E. freundii*, en particulier avec les souches d'*E. freundii* à antigène Vi. On constate en même temps une tendance marquée des fermentations plus faibles et mutatives pouvant conduire à la perte totale de ces capacités fermentatives. La fermentation primaire tardive du cellobiose et du D-arabinose par *E. freundii* est remplacée, chez presque toutes les souches de *Salmonella*, par une fermentation mutative intense. La fermentation du sorbose et du raffinose, exclusivement mutative chez les souches d'*E. freundii* à anti-

gène Vi, disparaît chez la plupart des souches de *Salmonella*. Par contre, les groupes biochimiques *E. coli* et *Klebsiella* se distinguent nettement d'*E. freundii* et *Salmonella* du point de vue des caractères étudiés.

D'après nos résultats, *E. coli* posséderait une spécificité particulière de fermentation des β -glucosides, la fermentation de la salicine étant sans rapport avec la fermentation du cellobiose et du lactose ; *E. coli* fermente également le sorbose et le D-arabinose d'une autre

TABLEAU I. — Propriétés des variantes lacto-positives de *Salmonella*.

Souches	Incubation en jours après laquelle on a obtenu la variante	Fermentation				
		lactose (Koser + 0,2% peptone)	lactose (eau peptonée)	Cellobiose (eau peptonée)	Arbutine (eau peptonée)	salicine (eau peptonée)
<i>S. typhi</i> (S 59)	inconnue	7 ⁺	9	+	5	4
<i>S. bispebjerg</i>	100	8	14	+	+	2
<i>S. abony</i>	53	10	+ 14 ⁺⁺	36 h	6	8
<i>S. derby</i>	76	4	6	+	6	-
<i>S. typhi murium</i>	92	11	+ 14	+	5	-
<i>S. brendenburg</i>	103	3	3	+	+	+
<i>S. lomita</i>	86	4	12	+	+	36 h
<i>S. bovis-morbificans</i>	130	5	7	+	-	-
<i>S. enteritidis</i>	83	6	+ 14	+	-	+
<i>S. anatum</i>	83	10	+ 14	36 h	4	3
<i>S. london</i>	92	3	3	+	+	+
<i>S. aberdeen</i>	98	4	7	+	+	3
<i>S. carrau</i>	92	6	10	+	3	-
<i>S. kirkee</i>	141	3	4	+	4	3
<i>S. onderstepoort</i>	100	7	12	+	+	-
<i>S. tel-aviv</i>	32	6	7	+	36 h	+
<i>S. senftenberg</i>	48	10	+ 14	+	2	-

+ = fermentation en vingt-quatre heures ; — = absence de fermentation en quatorze jours ; +) = fermentation en jours ; ++ = virage incomplet de l'indicateur en quatorze jours.

manière que *E. freundii*. De plus, *E. coli* n'utilise pas l'histidine comme source unique de carbone. Les souches de *Klebsiella* (*A. aerogenes*) attaquent le sorbose et le D-arabinose de la même manière que *E. coli* ; elles utilisent les acides chinique et malonique comme unique source de carbone et n'utilisent pas l'acide propionique.

Si l'on considère les ressemblances (SH_2 , IMVIC) et les dissemblances (KCN, décarboxylases, etc) entre *E. freundii* et les *Salmonella*, qui ressortent de la littérature et de nos résultats, on peut conclure que les *Salmonella* auraient subi, au cours de leur évolution phylogénétique, un processus d'orthogénèse et que leurs formes primaires se rapprocheraient probablement d'*E. freundii*.

SUMMARY

COMPARATIVE STUDY OF STRAINS OF *Escherichia freundii* AND *Salmonellae*.

The authors study the similitudes (SH_2 , IMVIC) and differences (KCN, decarboxylase, etc.) between *E. freundii* and the *Salmonellae*, according to literature and their own experience. They conclude that a process of orthogenesis has taken place during the evolution of the *Salmonellae*, the primitive forms of which were probably similar to that of *E. freundii*.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] SCHAFER (S.) et BENES (S.). *Ann. Inst. Pasteur*, 1959, **96**, 231.
[2, 3] KRISTENSEN (M.). *Acta pathol. Microbiol. scand.*, 1948, **25**, 244 et 1955, **36**, 576.

Les communications suivantes paraîtront en *Mémoire* dans les *Annales de l'Institut Pasteur* :

Contribution à l'étude de la structure périphérique des Mycobactéries, par J. DESBORDES, E. FOURNIER, F. FOURNIER et E. ROSENBERG.

Vaccinations contre la maladie de Teschen avec le virus de culture : anticorps et immunité, par P. BOURDIN et H. SERRES.

Un caractère différentiel des sous-souches du BCG, par K. C. GUPTA, M. PANISSET, J.-C. BENOIT et A. FRAPPIER.

Enregistrement des courbes de croissance microbienne par le microbiophotomètre électronique, par M. FAGUET.

Etude des facteurs extrinsèques de *Mycobacterium tuberculosis* rendant aléatoire sa culture *in vitro*, par P. J. COLETSOS.

LIVRES REÇUS

G. Morin. — *Physiologie du système nerveux central*. 3^e édition, 1 vol., 395 pages. Masson, édit., Paris, 1958.

Ce traité comprend 9 chapitres concernant successivement : les racines rachidiennes, la moelle épinière, le tonus musculaire, le cervelet, l'écorce cérébrale, le thalamus, l'hypothalamus, les noyaux gris de la base, la formation réticulée. Les acquisitions récentes sur les propriocepteurs musculotendineux ont été exposées dans le chapitre sur le tonus musculaire, ainsi que celles concernant l'organisation des

circuits nerveux intervenant à l'étage spinal. Les chapitres consacrés à l'hypothalamus, les noyaux gris centraux et à la formation réticulée, ont fait l'objet de nombreuses additions, ainsi que celui de l'écorce cérébrale. Les données expérimentales sur les aires associatives et le conditionnement ont été résumées. Ainsi présenté, cet ouvrage est, parmi ceux de langue française, l'un des plus aisés à consulter.

A. E.

Jean Bernard et M. Bessis. — *Hématologie clinique*. 1 vol., 526 p., 295 fig. et 37 pl. en couleurs. Masson, édit., Paris, 1958.

Ce traité de 526 pages réunit sous une forme très agréable les principaux faits qui concernent d'une part l'hématologie générale, d'autre part les lésions des trois séries d'éléments figurés. La dernière partie traite du diagnostic des différents syndromes : pancytopénie, anémies hémolytiques, splénomégalie, adénopathies, maladies infectieuses, éosinophilie, cancer. Ainsi conçu, ce livre permet au clinicien d'être informé des différentes questions concernant les hémopathies et des renseignements fournis par les sciences fondamentales. Les schémas proposés permettent d'interpréter le problème posé par les cas complexes et de le résoudre rapidement. Un très grand nombre de planches en couleurs ou de photographies en microscopie électronique rendent très attrayante la consultation de l'ouvrage.

A. E.

A. Névot. — *Le diagnostic bactériologique en pratique médicale*. 2^e édit. 1 vol. de 477 pages. Masson, édit., Paris, 1958.

De nombreux étudiants et directeurs de laboratoires d'analyses biologiques ont utilisé la première édition du livre de A. Névot. Cette deuxième édition est considérablement augmentée par rapport à la première et on y trouvera de nombreuses techniques nouvelles de valeur confirmée et d'utilité indiscutée pour le diagnostic bactériologique courant. L'auteur indique, dans la préface, que son but était de faire un livre donnant aux praticiens des laboratoires de diagnostic médical les connaissances essentielles qui leur permettront de fournir aux cliniciens des réponses rapides et le plus souvent très suffisantes. Il est certain qu'il y a réussi dans ce manuel dont la présentation est excellente, sauf peut-être la couverture qui, pour un livre d'usage courant, aurait gagné à être plus robuste.

L. L.

Comité mixte FAO/OMS d'experts de la Brucellose ; troisième rapport. Organisation mondiale de la Santé, Série de rapports techniques, 1958, n° 148 ; 58 pages. Prix : Fr. s. 2, --, 3/6 ou \$ 0,60. Publié également en anglais et en espagnol. Masson, concessionnaire pour la France.

Ce troisième rapport a été fait par le Comité d'experts réuni en 1957 à Lima. Le chapitre de la brucellose chez l'homme est essentiellement consacré à la thérapeutique par antibiotiques et antigénothérapie,

celui de la brucellose chez les animaux (bovins, caprins, ovins, porcins) aux méthodes de diagnostic et de vaccination. L'attention est appelée sur l'importance, comme source de contamination, du fromage fabriqué à partir de lait non pasteurisé, et la transmission éventuelle de la maladie par le lièvre qui serait souvent contaminé. Trois chapitres sont consacrés à la standardisation et l'interprétation de l'épreuve de séroagglutination, à l'isolement des *Brucella* et à l'identification des espèces de *Brucella*. Un certain nombre d'annexes viennent compléter ce document : interprétation d'agglutination du mucus vaginal, déviation du complément, préparation et étalonnage de l'antigène coloré pour l'épreuve de l'anneau sur le lait, propriétés de trois vaccins utilisés pour la prévention de l'infection à *Br. melitensis* chez les caprins, étalon international de sérum anti-*Brucella abortus*, milieux sélectifs pour la culture des *Brucella* à partir d'échantillons potentiellement contaminés.

L. L.

V. E. Albertsen, R. Benoit, T. Blom, Phyllis G. Croft, C. E. Dolman, H. Drieux, R. I. Hood, M. J. J. Houthuis, A. Jepsen, H. H. Johansen, M. M. Kaplan, S. O. Koch, G. Scaccia Scarafoni, G. Schmid, F. Schönberg et H. Thornton. — *L'hygiène des viandes*, Genève, 1958. *Organisation mondiale de la Santé : Série de Monographies*, n° 33 ; 561 pages, 106 illustrations, 2 planches en couleur, bibliographie, index. Prix : Fr. s. 26, - , £.2 5 s. ou \$ 8,75. Existe aussi en anglais. Concessionnaire pour la France : Masson, Paris.

Cette monographie très complète et richement illustrée réunit des études signées d'experts en hygiène des viandes, appartenant à diverses régions du monde.

Les auteurs ont couvert un champ très vaste. Ils traitent des précautions à prendre avant l'abattage, des problèmes d'hygiène dans la préparation industrielle et le commerce de la viande, de l'élimination et de la récupération des sous-produits, mais aussi de l'épidémiologie des maladies transmises par la viande et les produits carnés, de la formation des inspecteurs des viandes, de la pratique de l'hygiène des viandes dans un certain nombre de pays européens, et des questions particulières qui se posent dans les tropiques.

En annexe figurent des renseignements détaillés sur les techniques de laboratoire pour le diagnostic des maladies transmises par les viandes, les règlements en vigueur dans divers pays, les plans d'abattoirs. Un choix de références bibliographiques se rapportant aux divers chapitres complète ce volume.

On trouvera dans cette monographie plusieurs des communications — mises à jour — présentées au Colloque sur l'Hygiène des Viandes à Copenhague, en février 1954, un aperçu des discussions et des articles nouveaux. Ce volume n'est pas conçu comme un guide universel. Son but est plutôt d'indiquer les récents progrès effectués, les problèmes qui subsistent et d'appeler l'attention des autorités responsables, comme celle des étudiants en santé publique et en art vétérinaire, sur les divers aspects de ce vaste sujet.

L. L.

- D. Buckle et S. Lehovici. — *Les centres de guidance infantile*. Genève, 1958 (*Organisation mondiale de la Santé : Série de Monographies*, n° 40), 149 pages. Prix : Fr. s. 12.-, £ 1 ou \$ 4,00. (Masson, dépositaire pour la France.)

La notion de guidance infantile est relativement nouvelle. On entend par là une aide dirigée dont bénéficierait l'enfant qui, pour une raison ou une autre, n'est pas complètement adapté à son entourage immédiat. Tous ceux qui ont vu les centres de guidance infantile à l'œuvre sont persuadés qu'ils doivent devenir un élément essentiel dans la structure des services sociaux et médicaux. Malheureusement, on est encore loin de leur avoir accordé en Europe la place qui leur revient. Aussi est-il nécessaire de faire connaître les diverses activités de ces centres et d'en démontrer l'utilité. C'est le but que se propose l'O. M. S. en publiant une monographie sur les centres de guidance infantile.

Les auteurs, deux experts en santé mentale, ont voulu donner un cadre très large à leur étude en puisant dans la documentation du colloque qui s'est tenu à Lausanne sous les auspices du Bureau régional de l'O. M. S. pour l'Europe et qui a examiné les fonctions des centres de guidance et leur rapport avec d'autres services sociaux. L'ouvrage reflète donc les opinions variées qui se manifestent en la matière et envisage l'organisation des centres de guidance sous de multiples aspects. Il donne des renseignements détaillés sur leur situation, leur activité et leur équipement, sur les qualifications que doit posséder le personnel constituant l'équipe de guidance infantile, qu'il s'agisse du psychologue, du psychiatre, du travailleur social ou des spécialistes chargés de la rééducation. On y trouvera également un exposé des techniques spéciales à utiliser pour le dépistage, l'anamnèse, le diagnostic et le traitement des troubles du comportement chez l'enfant.

L. L.

- G. C. de Gruchy. — *Clinical haematology in medical practice*. 1 vol., 620 p., Blackwell Scient. Publ., Oxford, 1958. Prix : 50 shillings.

Ce manuel a été spécialement écrit pour le praticien de médecine générale et résume très clairement les notions les plus importantes en hématologie. Il ne prétend pas remplacer les traités d'hématologie classiques. Il est divisé en 15 chapitres traitant, notamment, des différents types d'anémies hypochromes, macrocytaires, microcytaires, aplastiques ou hémolytiques, en insistant sur les méthodes d'examen, du diagnostic et la discussion du traitement. Sont ensuite étudiés les neutropénies, la mononucléose infectieuse, les leucémies, la myélosclérose, la polyglobulie, les tumeurs du tissu lymphoïde, les hypersplénies, les troubles de la coagulation, du métabolisme, de l'hémoglobine, les groupes sanguins.

La présentation de l'ouvrage ainsi que son prix modique assureront son succès. On pourra regretter cependant que les références ne concernent que des travaux de langue anglaise, même lorsqu'il s'agit d'affections découvertes par des auteurs de langue différente, et que la publication de l'ouvrage de même qualité, dans une langue différente, ne puisse se faire à un prix aussi modeste.

A. E.

C. Bénézech. — *Physico-chimie biologique et médicale*. 1 vol., 684 p., Masson, édit., Paris, 1958.

Les deux premiers tiers de cet ouvrage exposent, d'une façon claire et précise, les notions essentielles de chimie-physique et de physique indispensables aux biologistes tant pour comprendre les processus physico-chimiques qui se déroulent dans les organismes que pour appliquer les méthodes de ces sciences à l'étude des phénomènes de la vie. On y trouve aussi bien les données fondamentales de la thermodynamique, de la cinétique et de l'électronique, que les propriétés classiques des solutions, des systèmes dispersés et des macromolécules. On est heureux d'y voir traiter en détail les propriétés optiques des solutions, bases de nombreuses méthodes de mesure utilisées en biologie. Dans la dernière partie, l'auteur traite du mécanisme physico-chimique de quelques grandes questions de biologie : structure des milieux biologiques, énergétique, réactions enzymatiques, échanges chez les êtres vivants, etc.

On serait mal venu de reprocher à l'auteur de n'avoir pas suffisamment approfondi certains problèmes — soit physico-chimiques, soit biologiques — puisqu'il dit lui-même s'être limité volontairement.

L'excellente présentation de ce livre contribue à en rendre la lecture particulièrement attrayante.

J.-J. P.

Edward Gurr. — *Methods of analytical histology and histochemistry*. 1 vol., 326 p., Leonard Hill, Londres, 1958. Prix : 70 shillings.

Cet ouvrage technique décrit plus de deux cents réactions colorées, faciles à réaliser au laboratoire, permettant la mise en évidence, dans les tissus, de groupements ou de corps chimiques définis.

Pour chacune des techniques exposées sont réunis, dans l'ordre, les réactifs nécessaires, le plan à suivre, les résultats à obtenir, le mécanisme probable de l'interaction génératrice de la coloration et souvent des observations concernant les applications ou les difficultés possibles. Les différentes sections analysent successivement la caractérisation des amino-acides, des protéines et des lipides, puis des pigments et de certains minéraux, enfin des enzymes et des hormones.

Plus de 200 références (articles originaux et monographies spécialisées) ainsi qu'une table des colorants avec leur formule développée complètent ce manuel, qui associe à l'exposé concis de techniques éprouvées, des considérations histo-chimiques théoriques pleines d'intérêt pour le non-spécialiste.

J. C. F.

J. T. Edsall et J. Wyman. — *Biophysical chemistry. Vol. I. Thermodynamics, electrostatics, and the biological significance of the properties of matter*. 1 vol., 699 p., Academic Press Inc., New York, 1958. Prix : \$ 14.

Cet ouvrage est issu d'un cours donné par les auteurs à Harvard depuis des années, sur la chimie physique des systèmes biochimiques. Son plan, fort original, ne suit pas le développement ordinaire des

manuels de chimie physique, mais entremêle continuellement les vues de biologie générale et les analyses strictes de la chimie physique.

L'ensemble donne cependant une impression d'unité tout en stimulant hautement l'esprit du lecteur. L'énumération des chapitres de ce premier volume illustre assez le point de vue des auteurs : Biochimie et Géochimie ; L'eau et son importance biologique ; Problèmes de la structure protéique ; Thermodynamique ; Electrostatique : son application aux molécules polaires et aux solutions ioniques ; Constantes diélectriques acide-base ; Polyacides, Bases et Ampholytes, y compris les Protéines ; Gaz carbonique et acide carbonique ; Quelques aspects généraux des interactions moléculaires.

En conséquence, ce volume, tout en étant d'une grande utilité, développera la culture générale du lecteur non spécialisé et constituera certainement un manuel usuel continuellement consulté par les expérimentateurs.

A. B.

Questions de santé mentale que pose l'utilisation de l'énergie atomique à des fins pacifiques. Rapport d'un groupe d'étude. Organisation mondiale de la Santé : Série de Rapports techniques, 1958, n° 151, 59 p. Prix : Fr. s. 2,- -, 3/6 ou \$ 0,60. Existe également en anglais ; édition espagnole en préparation. Concessionnaire pour la France : Masson, Paris.

« Le développement pacifique de l'énergie atomique est la plus grande aventure de l'humanité et, comme toute aventure, il comporte nécessairement des risques » (Mayneord). Consciente de ses responsabilités, l'O. M. S. s'intéresse à ce problème depuis plusieurs années et un rapport a déjà été publié sur les effets génétiques des radiations chez l'homme. Celui-ci examine une question sur laquelle on ne dispose que de peu de renseignements : les effets pathogènes des radiations sur le fonctionnement du cerveau. Il comprend aussi un exposé des opinions exprimées quant aux répercussions socio-économiques de l'énergie atomique, leur influence sur la santé mentale et les dangers inhérents à la désorganisation sociale qui pourrait résulter de la « deuxième révolution industrielle ». Il discute les attitudes du grand public, de la presse, des hommes de science et des autorités à l'égard de l'énergie atomique. Le dernier chapitre est consacré à un examen des mesures à prendre pour protéger la santé mentale.

L. L.

Mycologie médicale. 1 vol., 344 p. L'Expansion scient. franç., édit., Paris.

Ce très beau volume de 344 pages, orné de très nombreuses figures et de dix planches en couleurs, est publié par l'Institut Pasteur et la Société française de Mycologie médicale. Il groupe les rapports et communications présentés aux « Journées » du 14-15 décembre 1956 qui commémoraient la naissance officielle de cette jeune Société.

Les aspects cliniques et mycologiques des principales *mycoses métropolitaines* (aspergillome et aspergilloses, mycoses cérébrales, candidoses, dermatophytoses) et ceux de *mycoses tropicales* de premier plan (myc-

tomes, histoplasmose, chromoblastomycose, rhinosporidiose) sont suivis d'un important article sur les antifongiques et la thérapeutique des mycoses.

La mycologie prenant tous les jours plus d'importance, cet ouvrage, en fixant nos connaissances actuelles, intéressera les cliniciens et spécialistes autant que les hommes de laboratoire.

E. D.

Ciba Foundation Symposium on amino acids and peptides with anti-metabolic activity. 1 vol., 286 p., 28 fig. J. et A. Churchill, édit., 1958 Prix : 45 shillings.

Le titre du symposium et de l'ouvrage qui en est le rapport découle de la tendance qu'on a de concevoir un antibiotique comme un analogue structural d'un amide aminé ou d'un peptide : en tant que tel, l'antibiotique serait un inhibiteur compétitif de réactions essentielles auxquelles participent normalement les acides aminés ou les peptides et qui sont bloquées à ce stade. C'est cette notion qui guide l'esprit des biochimistes pour essayer d'expliquer le mode d'action des antibiotiques : cet ouvrage comporte quelques chapitres sur le mécanisme d'action du chloramphénicol, de l'azasérine, de la 6-diazo-5-oxo-L-nor-leucine ou D. O. N., de la β -2-thiénylalanine, etc. C'est cette notion d'analogue structural d'acides aminés et de peptides qui incite aussi les chimistes organiciens et les chimiothérapeutes à synthétiser et à essayer comme antibiotiques des substances synthétiques, dérivés de substitution d'acides aminés et de peptides : on trouve dans cet ouvrage plusieurs chapitres de synthèse organique en ce sens ; quelques chapitres sont consacrés à l'étude de substances antitumorales, tels le melphalan, l'amino-chlorambucil et divers acides aminés substitués soufrés, mais les résultats les plus favorables sont donnés avec des dérivés de la chloro-éthylamine dont la sarcolysine.

On trouve enfin dans cet ouvrage des notions récentes sur la structure chimique des actinomycines et sur leurs effets antitumoraux, ainsi que sur la chimie de la bacitracine.

F. B. H.

Fernand Lot. — *Les radio-isotopes au service de l'homme.* 1 vol., 83 p., publié par l'Organisation des Nations Unies, place de Fontenoy, Paris, 1958.

Cette petite brochure, éditée par l'UNESCO, contient l'essentiel des notions que le grand public doit avoir sur les radio-isotopes : les différentes phases de leur découverte, leurs caractères et l'aide que leur utilisation peut apporter en thérapeutique, dans l'industrie et en biologie.

A. E.

TABLE ALPHABÉTIQUE PAR NOMS D'AUTEURS

DU TOME 96

AIZAWA (K.) et VAGO (C.). — Sur l'infection à Borrelinavirus en culture de tissus	155
ALOUF (J.). — Voir RAYNAUD (M.).	
AMOUREUX (G.). — Voir GIRARD (O.).	
ANDRÉ (J.). — Voir HUARD (M.).	
ANDREJEW (A.), GERNEZ-RIEUX (Ch.) et TACQUET (A.). — Action de l'INH et de la D-cyclosérine sur la peroxydase purifiée et sur l'activité peroxydasique du bacille tuberculeux.	145
ASSO (J.). — Voir VERGE (J.).	
ATANASIU (P.) et LÉPINE (P.). — Multiplication du virus rabique des rues sur la tumeur épémdymaire de la souris en culture de tissus. Effet cytolytique	72
AUBERT (J.-P.), MILLET (J.) et MILHAUD (G.). — Isolement et propriétés du cytochrome C de <i>Thiobacillus denitrificans</i> . .	559
AUGIER (J.). — Le taux de croissance des bactéries du sol en fonction de la source énergétique. — I. Etude et conséquences.	217
BALICKA (N.), BARJAC (H. DE) et POCHON (J.). — Dégagement d'ammoniac par la microflore de certaines rhizosphères en milieu liquide	358
BARJAC (H. DE) et ROCHE (A.). — Deux cas de déséquilibre biologique en sols du Niger	601
— Voir BALICKA (N.).	
— Voir POCHON (J.).	
— Voir ROCHE (A.).	
BEAUFORT (M.). — Voir OYE (E. van).	
BEERENS (H.), GUILLAUME (J.) et PETIT (H.). — Etude de la fermentation propionique de la L(-)thréonine par 45 souches de bactéries anaérobies non sporulées à Gram négatif. .	211
BENES (S.). — Voir SCHAFLER (S.).	
BÉQUIGNON (R.), SERGENT (G.) et VIALAT (Ch.). — A propos des examens histologiques systématiques des névraxes d'animaux mordus	702
BEUMER-JOCHMANS (M. P.), DIRKX (J.) et OLEFFE-KOOPMANSCH (S.). — Effet du calcium sur la pénétration d'un phage dans certaines bactéries sensibles	771
BIRZU (N.). — Voir CONSTANTINESCO (N.).	
BONÉT-MAURY (P.). — Voir SERVANT (P.).	

- BONNET (J.-L.). — Voir SAINT-PAUL (M.).
- BOYER (F.) et CHEDID (L.). — Production d'une source abondante d'anticorps dans le liquide d'ascite obtenu par greffe du carcinome d'Ehrlich à la souris vaccinée avec *H. pertussis*. 643
- BRÈS (P.). — Voir CAMAIN (R.).
- BRISOU (J.), TYSSET (C.) et VACHER (B.). — Etude d'une souche d'*Achromobacter* : *A. stereotropis* 524
- — — Recherches sur les *Pseudomonadaceae*. Etude de deux souches de *Flavobacterium* isolées des poissons d'eau douce 633
- — — Etude de trois souches microbiennes (famille des *Pseudomonadaceae*) dont la synergie provoque une maladie de caractère septicémique chez les poissons blancs de la Dordogne, du Lot et de leurs affluents . . 689
- BRYGOO (E. R.). — Voir DODIN (A.).
- Voir SUREAU (P.).
- CAMAIN (R.) et BRÈS (P.). — Contribution à l'étude du virus de Coxsackie. Evolution des lésions chez le souriceau . . . 376
- CARAES (Y.). — Voir GIRARD (O.).
- CARRÉ (M.-C.). — Voir MAURIN (J.).
- CASTELLANI (A.). — Mise en évidence mycologique du saccharose, glucide non réducteur. Un champignon (*Candida tropicalis* Cast.) qui peut être considéré comme spécifique pour la mise en évidence de ce sucre parmi les substances non réductrices 253
- CHALLUT-THAL (F.). — Voir SOHIER (R.).
- CHALVIGNAC (M. A.), TYSSET (C.) et POCHON (J.). — Action de la truffe sur la microflore tellurique 355
- CHAMBON (L.). — Voir LE MINOR (L.).
- CHARIÉ-MARSAINES (Ch.). — Voir LE MINOR (L.).
- CHATAGNON (C.). — Voir MILHAUD (F.).
- CHEDID (L.). — Voir BOYER (F.).
- CHEVÉ (J.). — Voir GIRARD (O.).
- CIACCIO (G.). — Comportement du lapin adulte à l'inoculation du virus de Newcastle 245
- Essai de neutralisation du virus de Newcastle par le sérum de lapin et le lait de vache 500
- et GIROUD (P.). — Quelques remarques à propos d'une souche souris-jeune lapin de virus aphteux de type C 496
- COLLART (P.). Voir GASTINEL (P.).
- CONSTANTINESCO (N.), HORNET (T.), BIRZU (N.), ZAVATE (O.), PEUCEA (I.) et RUSAN (S.). — Rôle des bacilles tuberculeux tués dans la pathogénie de l'encéphalomyélite dite « allergique » provoquée par de l'extrait cérébral additionné avec des adjuvants de Freund 79
- CORVAZIER (R.). — Voir RAYNAUD (M.).

- COSAR (C.) et JULOU (L.). — Activité de l'(hydroxy-2'éthyl)méthyl-2 nitro-5 imidazole (8823 RP) vis-à-vis des infections expérimentales à *Trichomonas vaginalis* 238
- DARRASSE (H.). — Voir LE MINOR (L.).
- DEGOMMIER (J.). — Fluorescence et acido-alcool-résistance relative du bacille tuberculeux 723
- DELAGE (B.). — Voir LE MINOR (L.).
- DELAVILLE (M.). — Voir MUTERMILCH (S.).
- DIRKX (J.). — Voir BEUMER-JOCHMANS (P. M.).
- DOBEK (M.). — Action de l'isoniazide sur *Nocardia asteroides* *in vitro* et *in vivo* 116
- DODIN (A.), BRYGOO (E. R.) et SUREAU (P.). — Recherche et numération des Entérobactéries par hémoculture sur membranes filtrantes 489
- DRÉAN (D.). — Voir KIRSCH (P.).
— Voir LE MINOR (L.).
- DROUHET (E.). — Voir LEVADITI (J.-C.).
- DULONG DE ROSNAY (Ch.). — Voir MOUSTARDIER (G.).
- DUNOYER (F.). — Voir GASTINEL (P.).
- DUTHEIL (H.). — Voir PILLET (J.).
- EDWARDS (P. R.). — Voir FIFE (M. A.).
— Voir LE MINOR (L.).
- EYQUEM (A.), GUYOT-JEANNIN (N.) et PODLIACHOUK (L.). — Présence dans les immunosérums antibactériens de facteurs antiglobuliniques analogues à ceux de la polyarthrite chronique évolutive 295
— Voir FRANÇO (J. C.).
— Voir LILLE-SZYSZKOWICZ.
- FAUCONNIER (B.). — Utilisation des hématies hyperformolées en virologie. II. Mise au point d'un complexe virus-hématies, de longue conservation, utilisable pour le diagnostic des oreillons par une méthode d'inhibition de l'hémagglutination simplifiée 110
- FAURE (M.). — Voir PILLOT (J.).
- FIFE (M. A.), EDWARDS (P. R.), LE MINOR (L.) et SÉRIÉ (Ch.). — Six nouveaux types d'*Arizona* isolés de serpents en Ethiopie 487
— Voir LE MINOR (L.).
- FILS (J.). — Voir SEIGNEURIN (R.).
- FOURNIER (J.). — Voir HUARD (M.).
- FRANÇO (J. C.), EYQUEM (A.) et GUYOT-JEANNIN (N.). — Le pouvoir inhibiteur du sérum vis-à-vis du bactériophage T2r+ et la properdine 178
— — PODLIACHOUK (L.) et JACQUELINE (F.). — Etude immuno-électrophorétique des rhumatismes inflammatoires chroniques 413

- FREYDIER (J.). — Voir SOHIER (R.).
- GARDINI-TUESTA (W. E.). — Voir MARIAT (F.).
- GASTINEL (P.), COLLART (P.) et DUNOYER (F.). — Etude sur le comportement du tréponème de Reiter en milieu pénicilliné. 381
- GENGOU (O.). — Du rôle des alcalino-terreux dans l'hémolyse par certains sérums frais 1
- GÉRARD (S.). — Voir MUTERMILCH (S.).
- GERNEZ-RIEUX (Ch). — Voir ANDREJEW (A.).
- GIRARD (O.), NICOL (L.), CHEVÉ (J.), AMOUREUX (G.), ZOURBAS (J.) et CARAES (Y.). — Immunisation du nourrisson avec un vaccin triple anti-diphthérique, anti-tétanique, anti-coquelucheux adsorbé 491
- GIRARD (O.). — Voir PILLET (J.).
— Voir RAYNAUD (M.).
- GIROUD (P.). — Voir CIACCIO (G.).
- GRABAR (J.). — Action sur les tissus de la souris de certains vaccins préparés avec des souches de *Salmonella* pathogènes et non pathogènes pour cet animal 577
- GUILLAUME (J.). — Voir BEERENS (H.).
- GUYOT-JEANNIN (N.). — Voir EYQUEM (A.).
— Voir FRANCO (J. C.).
- HAMON (Y.). — Recherche et identification de la propriété colicinogène parmi les différents lysotypes d'*E. coli* pathogènes pour le nourrisson 614
- HANNOUN (C.). — Effet de l'instillation conjonctivale de virus grippal chez le lapin et chez la souris 170
- HENRY (G.). — Voir QUINCHON (C.).
- HENRY (M.). — Voir QUINCHON (C.).
- HÉRIN (V.). — Voir OYE (E. van).
- HORNET (T.). — Voir CONSTANTINESCO (N.).
- HRIBALOVA (V.) et STARKA (J.). — Relation entre l'activité respiratoire et la biosynthèse de la chlorotétracycline chez *Streptomyces aureofaciens*. 120
- HUARD (M.), ANDRÉ (J.) et FOURNIER (J.). — Essais de titrage des anticorps neutralisant le virus bovine pestique 506
- JACOTOT (H.), LEVADITI (J.-C.). et VALLÉE (A.). — Sur le pouvoir pathogène de certaines souches de vibrions habituellement considérés comme saprophytes 268
— et VALLÉE (A.). — Sur un critère du pouvoir pathogène des brucelles 54
— — Etude expérimentale d'une brucelle streptomycino-dépendante dérivée de la souche B19 (souche Olitzki) 481
— — Etude expérimentale d'une souche vaccinale de brucelle dérivée de la souche B19 (souche Zdrodovsky) 638
- JACQUELINE (F.). — Voir FRANCO (J. C.).
- JANSSEN (P.). — Voir OYE (E. van).

- JULOU (L.). — Voir COSAR (C.).
- KHOURY (B.). — Voir KIRSCHÉ (P.).
- KIRSCHÉ (P.), LE MINOR (L. et S.), KHOURY (B.) et DRÉAN (D.).
— Un nouveau sérotype de *Salmonella*: *S. niamey* . . . 642
- KOELMAN (M.). — Voir OSKAM (H. J.).
- KRASSILNIKOV (N. A.). — La classification des actinomycètes par
la méthode de la variation expérimentale 434
- KUCHAEVA (A. G.) et SKRYABIN (G. K.). — Utilisation des anta-
gonistes bactériens dans la lutte contre les infections des
plantes. 518
- LE CORROLLER (Y.). — Voir TOUMANOFF (C.).
- LE GALL (J.), SENEZ (J. C.) et PICHINOTY (F.). — Fixation de l'azote
par les bactéries sulfato-réductrices. Isolement et carac-
térisation de souches actives 223
- LE MINOR (L.), DARRASSE (H.) et CHARÉ-MARSAINES (Ch.). — Trois
nouveaux sérotypes de *Salmonella*: *S. ouakam*, *S. cam-
berene* et *S. yoff* 107
- EDWARDS (P. R.), FIFE (M. A.), CHAMBON (L.) et RAVISSE (P.).
— Six nouveaux sérotypes d'*Arizona* isolés de reptiles
normaux 485
- NÉEL (R.), DELAGE (B.) et DRÉAN (D.). — Un nouveau séro-
type de *Salmonella*: *S. tanger* 106
- Voir FIFE (M. A.).
- (L. et S.). — Voir KIRSCHÉ (P.).
- LÉPINE (P.). — Voir ATANASIU (P.).
- LEVADITI (J.-C.), DROUHET (E.), SEGRETAIN (G.) et MARIAT (F.). —
Sur le caractère histiocytaire de l'histoplasmose à petites
formes et le caractère giganto-cellulaire de l'histoplasmose
à grandes formes 659
- Voir JACOTOT (H.).
- LILLE-SZYSZKOWICZ et EYQUEM (A.). — Les groupes sanguins des
lapins 184
- LOISELEUR (J.). — Inhibition et activation du tissu conjonctif par
les sérums anti- et pro-hyaluronidase 32
- LOOY (G. van). — Voir OYE (E. van).
- LUCASSE (C.). — Voir OYE (E. van).
- LÜDERITZ (O.). — Voir STAUB (M. A.).
- LÜTZ (A.). — Données expérimentales sur la phényracilline et son
association avec la dihydrostreptomycine 260
- MALMANCHE (L.). — Voir TOUMANOFF (C.).
- MAGNIN (R.). — Voir SEIGNEURIN (R.).
- MANGALO (R.). — Voir RAYNAUD (M.).
- MARIAT (F.) et GARDINI-TUESTA (W. E.). — Pouvoir expérimental
d'une souche d'*Histoplasma capsulatum* isolée du singe
africain 669
- Voir LEVADITI (J.-C.).

- MAURIN (J.), VIRAT (J.) et CARRÉ (M.-C.). — Sur la fréquence des différents virus entériques isolés au cours de l'année 1957. 164
- MILHAUD (F.), CHATAGNON (C.), SANDOR (M.) et SANDOR (G.). — Une enquête humorale chez les psychopathes. Analyse statistique des résultats obtenus 114
- MILHAUD (G.). — Voir AUBERT (J.-P.).
- MILLET (J.). — Voir AUBERT (J.-P.).
- MORGAN (H. R.). — Voir PELMONT (J.).
- MOUSTARDIER (G.), DULONG DE ROSNAY (Ch.) et PASQUIER (P. du). — Recherches immunologiques sur le facteur activateur de la polyarthrite chronique évolutive 289
- — — et SALVAT (J.). — Etude de la sensibilité aux antibiotiques d'une souche de bacille de Whitmore 697
- MUTERMILCH (S.), GÉRARD (S.) et DELAVILLE (M.). — Contribution à l'étude du tréponème de Reiter 402
- MUTSAARS (W.). — La réactivation multiple du bactériophage inactivé par voie physique et chimique (3^e partie) 93
- NÉEL (L.). — Voir LE MINOR (L.).
- NICOL (L.). — Voir GIRARD (O.).
- OLEFFE-KOOPMANSCH (S.). — Voir BEUMER-JOCHMANS (M. P.).
- ORTA (B.). — Voir PILLET (J.).
- OSKAM (H. J.) et KOELMAN (M.). — Recherches sur l'antagonisme d'une part, et le renforcement d'activité d'autre part, de quelques antibiotiques combinés par paires 372
- OYE (E. van), LUCASSE (C.), HÉRIN (V.) et BEAUFORT (M.). — Trois nouveaux sérotypes du groupe *Salmonella* isolés au Congo belge : *S. inganda*, *S. ipeko* et *S. bolombo* 368
- VASSILLADIS (P.), JANSSENS (P.) et LOOY (G. van). — Une nouvelle *Salmonella* isolée au Congo belge : *S. bukavu*. 370
- PARAF (A.). — Voir VERGE (J.).
- PASQUIER (P. du). — Voir MOUSTARDIER (G.).
- PELMONT (J.) et MORGAN (H. R.). — Facteurs nutritifs influençant la croissance du virus de l'herpès dans la souche de cellules L de Earle 448
- PÉTTIT (H.). — Voir BEERENS (H.).
- PEUCEA (T.). — Voir CONSTANTINESCO (N.).
- PICHINOTY (F.). — Voir LE GALL (J.).
- PILLET (J.), GIRARD (O.), DUTHEIL (H.) et ORTA (B.). — Recherches sur l'immunisation de la brebis contre la mammite staphylococcique 365
- — — Mammite staphylococcique de la brebis et vaccination locale 591
- PILLOT (J.) et FAURE (M.). — Composition antigénique des tréponèmes. I. L'antigène protéique de groupe de la souche Reiter 196

- POCHON (J.), BARJAC (H. de) et ROCHE (A.). — Recherches sur la digestion de la cellulose chez le termite *Sphaeroterme sphaerotherax* 352
- Voir BALICKA (N.).
- Voir CHALVIGNAC (M.-A.).
- PODLIACHOUK (L.). — Le facteur sérique Gma dans le sérum d'animaux de différentes espèces 362
- Voir EYQUEM (A.).
- Voir FRANCO (J. C.).
- PRÉVOT (A.-R.) et SILLIOT (R.). — Activation de la toxinogénèse botulique D par *Bacillus licheniformis* 630
- PROVOST (A.). — Voir VILLEMOT (J.-M.).
- QUINCHON (C.), HENRY (M.) et HENRY (G.). — Propriétés biochimiques des germes coliformes hémolytiques isolés au cours du syndrome entérotoxique colibacillaire du porcelet . . . 765
- RAUD (G.), TYSSET (C.) et VACHER (B.). — Recherches sur les propriétés algostatiques de la 3-p-chlorophényl-1-1-diméthylurée (Monuron C. M. V.) en microbiologie du sol . . . 242
- RAVISSE (P.). — Voir LE MINOR (L.).
- RAYNAUD (M.), ALOUF (J.) et MANGALO (R.). — Croissance et toxino-génèse diphtériques en culture agitée sur milieu synthétique 276
- RELYVELD (E. H.), GIRARD (O.) et CORVAZIER (R.). — Préparation de sérums antidiphtériques de titre flocculant élevé et de faible pouvoir neutralisant par immunisation de chevaux sans immunité de base avec une anatoxine de haute pureté 129
- — TURPIN (A.) et MANGALO (R.). — Préparation d'anatoxines diphtérique, tétanique et staphylococcique de haute pureté, adsorbées sur phosphate de calcium (brushite). . . 60
- TURPIN (A.), RELYVELD (E. H.), CORVAZIER (R.) et GIRARD (O.). — Préparation d'antitoxine antitétanique par immunisation de chevaux avec des anatoxines de haute pureté. . . 649
- REGULARD (P.). — Voir YEU (F.).
- RELYVELD (E. H.) et RAYNAUD (M.). — Etude quantitative de la réaction entre la toxine diphtérique et divers sérums antidiphtériques de faible pouvoir neutralisant 537
- Voir RAYNAUD (M.).
- REY (L.). — Voir SERVANT (P.).
- ROCHE (A.). — L'action des phosphates insolubles sur les groupes microbiens telluriques 607
- et BARJAC (H. de). — Solubilisation des phosphates naturels par les germes du sol 781
- Voir BARJAC (H. de).
- Voir POCHON (J.).
- ROGER (A.). — Voir ROGER (F.).

- ROGER (F.) et ROGER (A.). — Le virus de l'avortement des ovins : sensibilité à quelques antibiotiques 461
- RUSAN (S.). — Voir CONSTANTINESCO (N.).
- SAINT-PAUL (M.) et BONNET (J.-L.). — Etude immunologique de certaines périspnésites expérimentales chez le chien 734
- SALVAT (J.). — Voir MOUSTARDIER (G.).
- SANDOR (G.). — Voir MILHAUD (F.).
- SANDOR (M.). — Voir MILHAUD (F.).
- SCHAFLEER (S.) et BENES (S.). — Recherches sur des souches d'*Escherichia freundii* à antigène Vi et leur position dans le groupe des *Escherichia freundii* 231
- et SCHAFLEER (C.). — Etude comparative sur des souches d'*Escherichia freundii* et des souches de *Salmonella* 788
- SEGRETAIR (G.). — Voir LEVADITI (J.-G.).
- Voir VIEU (M.).
- SEIGNEURIN (R.), MAGNIN (R.) et FILS (J.). — Résistance à l'hémolyse des hématies par adjonction d'antibiotiques 530
- SENEZ (J.-C.). — Voir LE GALL (J.).
- SERGENT (G.). — Voir BÉQUIGNON (R.).
- SÉRIÉ (Ch.). — Voir FIFE (M. A.).
- SERVANT (P.), REY (L.) et BONÉT-MAURY (P.). — Contribution à l'étude des conditions de conservation de la viabilité d'une souche de b. typhique par lyophilisation en vue de la fabrication d'un vaccin radio-inactivé. I. Etude de la phase de congélation initiale 755
- SILLIOT (R.). — Voir PRÉVOT (A.-R.).
- SOHIER (R.), THIVOLET (J.), FREYDIER (J.) et CHALLUT-THAL (F.). — Réactions de fixation du complément chez les sujets atteints de grippe asiatique et rôle de l'âge dans l'élaboration des anticorps réagissant avec différents antigènes du groupe A 513
- STAMATIN (N.). — Transduction phagique de la sporogénèse chez *B. anthracis* 502
- STARKA (J.). — Voir HRIBALOVA (V.).
- STAUB (A. M.), TINELLI (R.), LÜDERITZ (O.) et WESTPHAL (O.). — Etude immuno-chimique sur les *Salmonella*. V. Rôle de quelques sucres, et en particulier des 3-6 didésoxyhexoses, dans la spécificité des antigènes O du tableau de Kauffmann-White 303
- SUREAU (P.) et BRYGOO (E. R.). — Culture du virus de la vaccine. II. Culture sur cellules épithéliales de rein de veau en couche monocellulaire 343
- Voir DODIN (A.).
- TACQUET (A.). — Voir ANDREJEW (A.).
- THIVOLET (J.). — Voir SOHIER (R.).
- TINELLI (R.). — Voir STAUB (A. M.).

TOUMANOFF (C.). — Observation concernant le rôle probable d'un prédateur dans la transmission d'un bacille aux chenilles de <i>Pieris brassicae</i>	108
— et LE CORROLLER (Y.). — Contribution à l'étude de <i>B. cereus</i> Frank et Frank cristallophores et pathogènes pour les larves de Lépidoptères	680
— et MALMANCHE (L.). — L'action des antibiotiques sur des souches de <i>Bacillus larvae</i> White d'origine géographique différente	140
TURPIN (A.). — Voir RAYNAUD (M.).	
TYSSET (C.). — Voir BRISOU (J.).	
— Voir CHALVIGNAC (M.-A.).	
— Voir RAUD (G.).	
VACHER (B.). — Voir BRISOU (J.).	
— Voir RAUD (G.).	
VAGO (C.). — Voir AIZAWA (K.).	
VALLÉE (A.). — Voir JACOTOT (H.).	
VASSILIADIS (P.). — Voir OYE (E. van).	
VERGE (J.), PARAF (A.) et ASSO (J.). — Le phénomène d'adaptation spécifique des ultravirus en fonction de l'âge des animaux	16
VIALAT (Ch.). — Voir BÉQUIGNON (R.).	
VIEU (M.) et SEGRETAIN (G.). — Contribution à l'étude de <i>Geotrichum</i> et <i>Trichosporum</i> d'origine humaine	421
VILLEMOT (J.-M.) et PROVOST (A.). — Etude sur l'antigène soluble du virus rabique	712
VIRAT (J.). — Voir MAURIN (J.).	
WESTPHAL (O.). — Voir STAUB (A. M.).	
WORK (E.). — The action of a lytic enzyme from spores of a <i>Bacillus</i> on various species of bacteria	468
YEU (F.) et RECLARD (P.). — Détoxication et purification du sérum anti-virus de Carré équin obtenu par injection d'organes virulents de furet	333
ZAVATE (O.). — Voir CONSTANTINESCO (N.).	
ZOURBAS (J.). — Voir GIRARD (O.).	

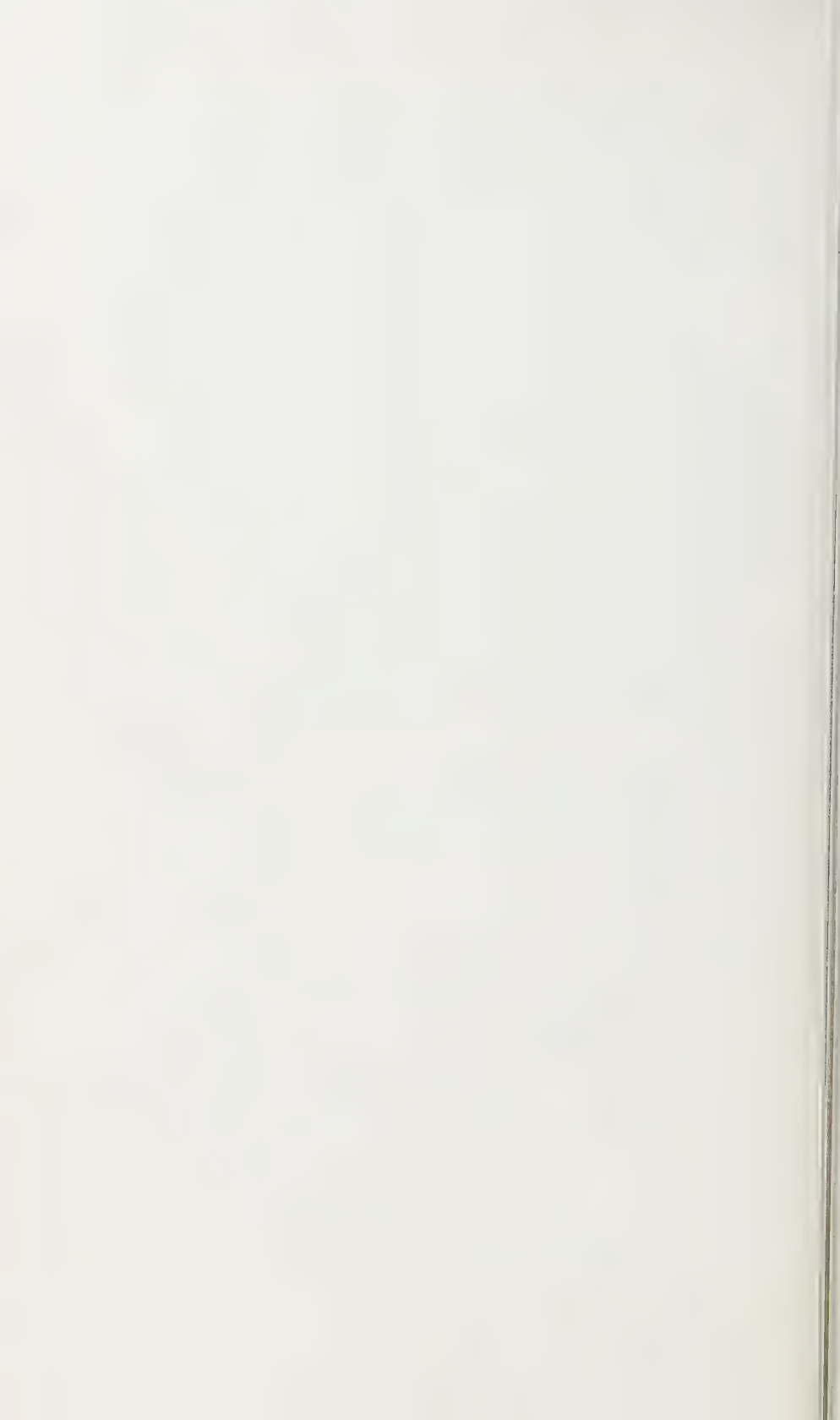


TABLE ANALYTIQUE

DU TOME 96

<i>Achromobacter</i> . Etude d'— <i>stereotropis</i>	524
<i>Actinomycètes</i> . Classification par la méthode de la variation expérimentale	434
<i>Anaérobies</i> . Fermentation de la L(-)thréonine par 45 souches non sporulées, Gram-négatives	211
<i>Anatoxine</i> . Préparation d'— diphtérique, tétanique et staphylococcique de haute pureté adsorbées sur phosphate de calcium . . .	60
<i>Antibiotiques</i> . Action des — sur <i>Bacillus larvae</i>	140
— Etude expérimentale de la phényracilline	260
— Antagonisme et synergie de quelques — combinés par paires .	372
— Effet des — sur les infections des plantes	548
— Voir aussi <i>Avortement</i> , <i>Hémolyse</i> .	
<i>Arizona</i> . Six nouveaux sérotypes isolés de reptiles normaux . .	485
— Six nouveaux types isolés de serpents en Ethiopie	487
<i>Avortement</i> . Sensibilité aux antibiotiques du virus de l'— des ovins	461
<i>Bactéries sulfato-réductrices</i> . Fixation de l'azote par les — — .	223
<i>Bactériophage</i> . Réactivation multiple du — inactivé par voie physique et chimique	93
— Pouvoir inhibiteur du sérum vis-à-vis du — T2r+	178
— Transduction de la sporogénèse chez <i>B. anthracis</i>	502
— Effet du calcium sur la pénétration d'un — dans certaines bactéries sensibles	771
— Voir aussi <i>Colicine</i> .	
<i>Botulisme</i> . Activation de la toxinogénèse B par <i>B. licheniformis</i> . .	630
<i>Brucella</i> . Un critère du pouvoir antigène des —	54
— Brucelle streptomycino-dépendante dérivée de la souche B19 (souche Olitzki)	481
— Souche vaccinale dérivée de la souche B19 (Zdrodovsky) . . .	638
<i>Carré</i> . Détoxication du sérum anti-virus de — équin obtenu par injection d'organes virulents de furet	333
<i>Cellulose</i> . Digestion de la — chez le termite <i>Sphaerotermes sphaerotherax</i>	352
<i>Champignons</i> . Mise en évidence du saccharose au moyen de <i>Candida tropicalis</i> Cast.	253
— Etude de <i>Geotrichum</i> et <i>Trichosporum</i> d'origine humaine . .	421

— Pouvoir pathogène expérimental d'une souche d' <i>Histoplasma capsulatum</i> isolée du singe africain	669
— Caractère histiocytaire de l'histoplasmose à petites formes et caractère giganto-cellulaire de l'histoplasmose à grandes formes.	659
<i>Colicine</i> . Identification de la propriété colicinogène des différents lysotypes d' <i>E. coli</i> pathogènes pour le nourrisson	614
<i>Coliformes</i> . Propriétés biochimiques des germes — hémolytiques isolés chez le porcelet	765
<i>Conjonctif (tissu)</i> . Inhibition et activation du tissu —	32
<i>Coxsackie</i> . Evolution des lésions chez le souriceau	376
<i>Cultures de tissus</i> . Voir <i>Herpès</i> , <i>Insectes</i> , <i>Vaccine</i> .	
<i>Cyclosérine</i> . Action de la D-cyclosérine sur la peroxydase purifiée et sur l'activité peroxydasique des bacilles tuberculeux	115
<i>Cytochrome</i> . Isolement et propriétés du — C de <i>Thiobacillus denitrificans</i>	559
<i>Diphthérie</i> . Préparation de sérum anti-diphthérique chez les chevaux Schick-positifs avec une anatoxine de haute pureté	129
— Croissance et toxinogénèse diphthériques en culture agitée sur milieu synthétique	276
— Etude quantitative de la réaction entre la toxine diphthérique et divers sérums de faible pouvoir neutralisant	537
— Voir aussi <i>Anatoxine</i> .	
<i>Encéphalomyélite allergique</i> . Rôle des B. K. dans la pathogénie.	79
<i>Entérobactéries</i> . Recherche et numération par hémoculture sur membranes filtrantes	489
<i>Enzymes</i> . Action d'un — lytique provenant des spores d'un <i>Bacillus</i>	468
<i>Escherichia freundii</i> . Souches à antigène Vi et leur position taxonomique	231
— Origine commune possible d'— — et des <i>Salmonella</i>	788
<i>Fièvre aphteuse</i> . Etude d'une souche souris adaptée au jeune lapin.	496
<i>Grippe</i> . Instillation conjonctivale du virus au lapin et à la souris.	179
— Rôle de l'âge dans les réactions sériques avec le virus asiatique.	513
<i>Groupes sanguins</i> . Les — — des lapins	181
— Le facteur Gma dans le sérum de différentes espèces animales.	362
<i>Hématies</i> . Voir <i>Oreillons</i> .	
<i>Hémolyse</i> . Rôle des alcalino-terreux	1
— Résistance à l'— des hématies par adjonction d'antibiotiques.	530
<i>Hemophilus pertussis</i> . Production expérimentale d'anticorps dans le liquide d'ascite de la souris	613
<i>Herpès</i> . Croissance du virus en cellules L de Earle	418
<i>Hyaluronidase</i> . Voir <i>Conjonctif (tissu)</i> .	
<i>Immunologie</i> . Etude immunologique de certaines périsplénites expérimentales chez le chien	731
— Voir aussi <i>Rhumatismes</i> .	

<i>INH.</i> Action de l'— sur <i>Nocardia asteroides</i>	116
— Action sur la peroxydase purifiée et sur l'activité peroxydasique des bacilles tuberculeux	145
<i>Insectes.</i> Rôle d'un prédateur dans la transmission d'un bacille aux chenilles de <i>Pieris brassicae</i>	108
— L'infection à Borrelinavirus en cultures de tissus d'insectes .	455
— Etude de <i>B. cereus</i> cristallophores et pathogènes pour les larves de Lépidoptères	680
<i>Mammite.</i> Voir <i>Staphylocoque</i> .	
<i>Newcastle.</i> Inoculation du virus au lapin adulte	245
— Neutralisation du virus par le sérum de lapin et le lait de vache	500
<i>Oreillons.</i> Diagnostic au moyen d'hématies formolées	110
<i>Peste bovine.</i> Titrage des anticorps neutralisants	506
<i>Poissons.</i> Voir <i>Pseudomonadaceae</i> .	
<i>Polyarthrite chronique évolutive.</i> Voir <i>Rhumatismes</i> .	
<i>Pseudomonadaceae.</i> Deux souches de <i>Flavobacterium</i> isolées de poissons d'eau douce	633
— Trois souches de — dont la synergie provoque une maladie septicémique chez les poissons d'eau douce	689
<i>Psychopathes.</i> Enquête humorale chez les —	111
<i>Rage.</i> Multiplication du virus rabique des rues sur la tumeur épémdymaire de la souris. Effet cytolitique	72
— Examens histologiques systématiques du névraxe des animaux mordeurs	702
— Etude sur l'antigène soluble du virus	712
<i>Rhumatismes.</i> Recherches immunologiques sur le facteur activateur de la polyarthrite chronique évolutive	289
— Présence dans les immunsérums antibactériens de facteurs antiglobuliniques analogues à ceux de la polyarthrite chronique évolutive	295
— Etude immuno-électrophorétique des — inflammatoires chroniques	413
<i>Salmonella.</i> Un nouveau sérotype, <i>S. tanger</i>	106
— Trois nouveaux sérotypes : <i>S. ouakam</i> , <i>S. camberene</i> et <i>S. yoff</i> .	107
— Rôle des 3-6-didésoxyhexoses dans la spécificité des antigènes O .	303
— Trois nouveaux sérotypes isolés au Congo belge : <i>S. inganda</i> , <i>S. ipeko</i> et <i>S. bolombo</i>	368
— Nouvelle — isolée au Congo belge : <i>S. bukawu</i>	370
— Action sur les tissus de la souris de certains vaccins préparés avec des souches de — pathogènes et non pathogènes pour cet animal	577
— Nouveau sérotype : <i>S. niamey</i>	642
— Vaccin lyophilisé et radio-inactif	755
— Voir aussi <i>Escherichia freundii</i> .	
<i>Sérum.</i> Voir <i>Psychopathes</i> .	

<i>Sol.</i> Croissance des bactéries en fonction de la source énergétique	217
— Propriétés algostatiques du Monuron	242
— Action de la truffe sur la microflore tellurique	355
— Dégagement d'ammoniaque par la microflore de certaines rhizosphères en milieu liquide	358
— Deux cas de déséquilibre biologique en — du Niger	601
— L'action de phosphates insolubles sur les groupes microbiens du —	607
— Solubilisation de phosphates naturels par les germes du —	781
<i>Staphylocoques.</i> Immunisation de la brebis contre la mammites staphylococcique	365
— Mammites de la brebis et vaccination locale	591
— Voir aussi <i>Anatoxine</i> .	
<i>Termite.</i> Voir <i>Cellulose</i> .	
<i>Tétanos.</i> Préparation d'antitoxine antitétanique par immunisation de chevaux avec des anatoxines de haute pureté	649
— Voir aussi <i>Anatoxine</i> .	
<i>Toxoplasme.</i> Voir <i>Rage</i> .	
<i>Tréponèmes.</i> Composition antigénique du — de Reiter	196
— Comportement du — de Reiter en milieu pénicilliné	381
— Etude du — de Reiter	402
<i>Trichomonas.</i> Action du 8823 RP dans les infections expérimentales à — <i>vaginalis</i>	238
<i>Tuberculose.</i> Fluorescence et acido-alcool-résistance relative du bacille tuberculeux	723
— Voir aussi <i>Cyclosérine</i> , <i>INH</i> .	
<i>Vaccin.</i> Voir <i>Salmonella</i> .	
<i>Vaccinations associées.</i> Immunisation du nourrisson avec un vaccin triple antidiphtérique, antitétanique, anticoquelucheux adsorbé	491
<i>Vaccine.</i> Culture du virus sur cellules épithéliales de rein de veau	343
<i>Vibrions.</i> Pouvoir pathogène de certaines souches habituellement considérées comme saprophytes	268
<i>Virus.</i> Adaptation spécifique des — en fonction de l'âge des animaux	16
— Virus entériques isolés en 1957	164
— Voir aussi aux différents virus.	
<i>Whitmore (bacille de).</i> Sensibilité aux antibiotiques	697

TABLE DES OUVRAGES PRÉSENTÉS OU REÇUS

DU TOME 96

ALBERTSON (V. E.) et coll. — <i>L'hygiène des viandes</i> (Monographie de l'O. M. S.)	796
BACQ (Z. M.) et coll. — <i>Actualités pharmacologiques</i>	647
BALDWIN (E.). — <i>Dynamic aspects of biochemistry</i>	126
BÉNÉZECH (C.). — <i>Physico-chimie biologique et médicale</i>	798
BERNARD (J.) et BESSIS (M.). — <i>Hématologie clinique</i>	795
BLOCK (R. J.), DURRUM (E. L.) et ZWEIG (G.). — <i>A manual of paper chromatography and paper electrophoresis</i>	125
BUCKLE (D.) et LEBOVICI (S.). — <i>Les centres de guidance infantile</i> (Monographie de l'O. M. S.)	797
Ciba Foundation Colloquia on ageing	249
Ciba Foundation Symposium on aminoacids and peptides with antimetabolic activity	800
Comité mixte F. A. O./O. M. S. d'experts de la brucellose. 3 ^e Rapport.	795
EDSALL (J. T.) et WYMAN (J.). — <i>Biophysical chemistry</i> . Vol. I.	798
FRAPPIER (A.) et PANISSET (M.). — <i>La souche du BCG</i>	128
GÖZSY (B.) et KATO (L.). — <i>Studies on phagocytic stimulation</i>	126
GRUCHY (G. C. DE). — <i>Clinical haematology in medical practice</i>	797
GRUMBACH (A.) et KIKUTH (W.). — <i>Les maladies infectieuses de l'homme et leurs agents pathogènes</i>	127
GURR (E.). — <i>Methods of analytical histology and histochemistry</i>	798
JACOBS, GERSTEIN et WALTER. — <i>Dictionary of microbiology</i>	511
<i>Lectures on the scientific basis of medicine</i>	251
LOT (F.). — <i>Les radio-isotopes au service de l'homme</i>	800
MORIN (G.). — <i>Physiologie du système nerveux central</i>	794
MORRIS (N. F.) et MACCLURE BROWNE (J. C.). — <i>A symposium on non toxæmic hypertension in pregnancy</i>	251
<i>Mycologie médicale</i>	799
NÉVOT (A.). — <i>Le diagnostic bactériologique en pratique médicale</i> , 2 ^e édition.	795
OGATA (N.). — <i>Rickettsia tsutsugamushi</i>	252
OTTE (H. J.) et KOEHLER (W.). — <i>Die Praxis der Resistenz- und Spiegelbestimmungen zur antibiotischen Therapie</i>	510
PELCZAR (M. J.) et REID (R. D.). — <i>Microbiology</i>	250
PRIGGE (R.). — <i>Arbeiten aus dem Paul-Ehrlich-Institut, 1958</i>	511
<i>Problèmes actuels posés par les endocardites malignes. Rapports présentés au XXXI^e Congrès Français de Médecine, Paris, 1957.</i>	125

<i>Questions de santé mentale que pose l'utilisation de l'énergie atomique à des fins pacifiques. O. M. S.</i>	799
RACE (R. R.) et SANGER (R.). — <i>Blood groups in man</i>	251
SEELIGER (H. P. R.). — <i>Listeriose</i>	510
SINCLAIR (H. M.). — <i>Essential fatty acids</i>	249
STANIER (R. Y.), DOUDOROFF (M.) et ADELBERG (E. A.). — <i>General microbiology</i>	512
TARNOKY (A.). — <i>Clinical biochemical methods</i>	126
WALTER (A. M.). — <i>Neue Tuberkulostatika und Tuberkulostatika-resistenz von Tuberkelbakterien</i>	127
YOUNG (L.) et MAW (G. A.). — <i>The metabolism of sulphur compounds</i>	252

DATE DUE

[illegible]

DEMCO 38-297